



Extension du spectre mutationnel des gènes ITGA2B-ITGB3 et corrélation génotypephénotype dans la thrombasthénie de Glanzmann

Mathieu Fiore

► To cite this version:

Mathieu Fiore. Extension du spectre mutationnel des gènes ITGA2B-ITGB3 et corrélation génotypephénotype dans la thrombasthénie de Glanzmann. Génétique. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0273 . tel-01182690

HAL Id: tel-01182690

<https://theses.hal.science/tel-01182690>

Submitted on 7 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par **Mathieu FIORE**

**Extension du spectre mutationnel des gènes *ITGA2B-ITGB3* et
corrélation génotype-phénotype dans la thrombasthénie de Glanzmann**

Sous la direction de **Xavier PILLOIS**

Soutenue le 15 décembre à Pessac

Jury

Monsieur le Pr Benoît ARVEILLER, PU-PH , Université de Bordeaux	Président
Madame le Pr Marie-Christine ALESSI, PU-PH, Université de Marseille	Rapporteur
Monsieur le Dr François LANZA, DR, Université de Strasbourg,	Rapporteur
Monsieur le Dr Jean-Max PASQUET, CR, Université de Bordeaux	Invité
Monsieur le Dr Xavier PILLOIS, Ingénieur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Titre : Extension du spectre mutationnel des gènes *ITGA2B-ITGB3* et corrélation génotype-phénotype dans la thrombasthénie de Glanzmann

Résumé : La thrombasthénie de Glanzmann (TG) est une maladie autosomique récessive liée à un déficit quantitatif et/ou qualitatif de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, principale glycoprotéine présente à la surface des plaquettes. Ce complexe sert de récepteur au fibrinogène plasmatique, permettant ainsi aux plaquettes de s'agréger entre-elles. Notre étude visait à caractériser les anomalies génétiques responsables de TG chez 76 familles d'origine différente. Les signes hémorragiques présentés par les patients étaient principalement des épistaxis, des pétéchies, des saignements gastro-intestinaux ou des ménorragies. Les mutations présentes dans les gènes *ITGA2B* ou *ITGB3* ont été identifiées par séquençage direct. Tous les exons, ainsi que les régions introniques flanquantes, ont été étudiées, permettant ainsi d'identifier 78 variations génétiques, dont 57 n'avaient jamais été rapportées. Des mutations tronquantes ou de l'épissage étaient présentes dans près de la moitié des cas. Les mutations faux-sens représentaient également une forte proportion des anomalies moléculaires retrouvées (50% environ). Le caractère délétère de ces mutations a été confirmé par l'utilisation de méthodes *in silico* et/ou *in vitro*, permettant de caractériser les domaines essentiels à la structure et à la fonction des sous-unités α_{IIb} et β_3 . En termes de corrélation génotype-phénotype, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'association claire entre certaines mutations et le syndrome hémorragique présenté par les patients. Cependant, ce travail permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la structure et le fonctionnement de la principale intégrine plaquettaire.

Mots clés : Thrombasthénie de Glanzmann, Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, *ITGA2B*, *ITGB3*

Title: Mutational spectrum of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin in Glanzmann thrombasthenia and genotype-phenotype correlation analysis

Abstract: Glanzmann thrombasthenia (GT) is a rare autosomal recessive disorder characterized by quantitative and/or qualitative defect of the platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. Naturally occurring mutations in *ITGA2B* or *ITGB3* genes are responsible for the disease. Sanger sequencing analysis was applied to mutation screening of 83 diagnosed GT patients. 78 different sequence variations were identified of which 57 had never been previously described. Among the novel identified mutations, truncative, missense and splice site mutations were observed. Therefore, we have identified a spectrum of unreported mutations that may be of value to decipher the role of specific regions within $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Keywords: Glanzmann thrombasthenia, $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, *ITGA2B*, *ITGB3*

Unité de recherche

[Adaptation Cardio-Vasculaire à l'Ischémie, n° 1034, et Av. du Haut-Lévêque 33604, Pessac]

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Président de jury,

Professeur Benoît ARVEILLER,

Professeur des Universités, Université Victor Segalen, Bordeaux 2

Praticien Hospitalier, Laboratoire de Génétique, CHU de Bordeaux

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté la présidence de cette thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

À mon Directeur de thèse,

Xavier PILLOIS,

Ingénieur de Haut-Rang scientifique, CHU de Bordeaux

Je tiens à te remercier d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je te remercie également pour ta rigueur et les connaissances que tu m'as transmises. Je te suis très reconnaissant du temps et de l'attention que tu m'as consacré au cours de ce travail et pour l'intérêt et le soutien permanent que tu m'as porté au cours de ces années.

À mes Juges,

Madame le Professeur Marie-Christine ALESSI,

Docteur en Médecine

Professeur des Universités, Laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital de La Timone,
Marseille

Je vous remercie d'avoir bien voulu lire et critiquer mon travail. Veuillez trouver l'expression de ma sincère et profonde estime ainsi que toute ma gratitude.

Monsieur le Docteur François LANZA,

Directeur de Recherche, EFS de Strasbourg

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Permettez-moi de vous témoigner de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Jean-Max PASQUET

Chargé de Recherche, InsermU1035, Université de Bordeaux

Je te remercie d'avoir bien voulu me lire.

Je tiens à t'exprimer mon profond respect, ma sincère admiration, et toute ma reconnaissance.

À toutes les personnes de l'équipe de l'unité InsermU1034, du laboratoire d'hématologie du CHU de Bordeaux et du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (Alan T. et Paquita Nurden).

À ma famille,

Je vous remercie de l'affection, du soutien, de la confiance que vous m'avez apportée tout au long de ces années. Je vous témoigne à travers ce travail, toute ma reconnaissance et mon affection.

Liste des publications et communications en rapport avec ce travail

ARTICLES SCIENTIFIQUES

- Pillois X, **Fiore M**, Heilig R, Pico M, Nurden AT. A novel amino acid substitution of integrin α_{IIb} in Glanzmann thrombasthenia confirms that the N-terminal region of the receptor plays a role in maintaining β -propeller structure. *Platelets*, 2013; 24(1):77-80.
- **Fiore M**, Nurden AT, Nurden P, Seligssohn U. Clinical utility gene card for: Glanzmann thrombasthenia. *Eur J Hum Genet*. 2012, Oct; 20 (10).
- **Fiore M**, Firah N, Pillois X, Nurden P, Heilig R, Nurden AT. Natural history of platelet antibody formation against $\alpha_{IIb}\beta_3$ in a French cohort of Glanzmann thrombasthenia patients. *Haemophilia*. 2012 May;18(3).
- Nurden AT, **Fiore M**, Nurden P, Pillois X. Glanzmann thrombasthenia: a review of *ITGA2B* and *ITGB3* defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*. 2011 Dec 1;118(23):5996-6005.

COMMUNICATIONS ORALES

2012: • 58th Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis – Liverpool (Angleterre): “*Development of antibodies to $\alpha_{IIb}\beta_3$ in a French cohort of Glanzmann thrombasthenia patients*”

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

2014: • Journées scientifiques de l'école doctorale de Bordeaux – Arcachon: “*Functional characterization of a novel splicing mutation in the ITGA2B gene associated with Glanzmann thrombasthenia*” (**Mathieu Fiore**, Alan T Nurden, Paquita Nurden, Xavier Pillois)

2013: • European Society of Human Genetic – Paris (France): “*Origin of the Manouche gypsies in France - how did it all begin: lesson learnt from a founder mutation associated with Glanzmann thrombasthenia*” (X. Pillois N. Firah, P. Nurden, R. Heilig, A. T. Nurden and **M. Fiore**)

2012: • 58th Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis – Liverpool (Angleterre): “*Identification of 61 novel mutations in the ITGA2B and ITGB3 genes of 90 patients with Glanzmann thrombasthenia: relation structure-fonction*” (X. Pillois, C. Vinciguerra, R. Heilig, P. Nurden, **M. Fiore**, A. Nurden)

- 6^{ème} Assises de Génétique Humaine et Médicale – Marseille : « *Étude génotypique de 90 malades atteints de thrombasthénie de Glanzmann* » (**Mathieu Fiore**, Xavier Pillois, Christine Vinciguerra, Paquita Nurden, Roland Heilig, et Alan T Nurden)

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION.....	13
1.1 PLAQUETTES SANGUINES ET HÉMOSTASE PRIMAIRE.....	14
<i>1.1.1 Plaquettes</i>	<i>14</i>
<i>1.1.2 Hémostase primaire</i>	<i>16</i>
1.1.2.1 Adhésion.....	16
1.1.2.2 Activation	17
1.1.2.3 Agrégation	17
1.3.2.1 Défaut d'agrégation plaquettaire : la thrombasthénie de Glanzmann.....	18
1.2 INTÉGRINE ALPHA_{IIb}BÊTA₃	21
<i>1.2.1 Gènes ITGA2B et ITGB3</i>	<i>21</i>
1.2.1.1 Structure, expression et modifications post-traductionnelles.....	21
1.2.1.2 Spectre mutationnel des gènes ITGA2B et ITGB3	22
1.2.1.3 Particularités des mutations du site d'épissage	25
1.2.1.4 Mutation gitane	25
<i>1.2.2 Structure du complexe</i>	<i>26</i>
1.2.2.1 Domaine extracellulaire	26
1.2.2.2 Domaine transmembranaire	33
1.2.2.3 Domaine cytoplasmique	34
<i>1.2.3 Fonctions de l'intégrine.....</i>	<i>35</i>
1.2.2.1 Inside-Out signaling.....	35
1.2.2.2 Outside-In signaling.....	37
2 OBJECTIFS DU TRAVAIL	40
2.1 SPECTRE MUTATIONNEL DES GÈNES ITGA2B-ITGB3 ET RELATION STRUCTURE-FONCTION DE LA PROTÉINE ALPHA_{IIb}BÊTA₃.....	40
2.2 CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE	42
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	45
3.1 SÉLECTION DES PATIENTS.....	45
3.2 SÉQUENÇAGE DE L'ADN	46
3.2.1 Design des primers.....	46
3.2.2 Conditions d'amplification	47
3.2.3 Réactions de séquence et analyses des résultats de séquençage.....	47
3.3 ANALYSES FAMILIALES	48
3.4 ANALYSES IN SILICO.....	48
3.4.1 Prédiction de l'effet pathogène des mutations faux-sens	49
3.4.2 Mutations affectant l'épissage.....	50

3.5 RECHERCHE DE GRANDS RÉARRANGEMENTS GÉNOMIQUES	50
3.5.1 <i>Conditions d'amplification</i>	50
3.5.2 <i>Analyses des résultats</i>	51
3.6 ÉTUDES PAR MINIGÈNE	51
3.7 MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE ET EXPRESSION DANS UN MODÈLE CELLULAIRE	
HÉTÉROLOGUE	52
3.7.1 <i>Mesure par cytométrie en flux</i>	52
3.7.2 <i>Western-Blotting</i>	53
3.8 MODÉLISATION PROTÉIQUE STATIQUE	53
3.9 MODÉLISATION PROTÉIQUE DYNAMIQUE	53
4 RÉSULTATS	55
4.1 PHÉNOTYPE DES PATIENTS	55
4.2. GÉNOTYPE DES PATIENTS	55
4.3 CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE	88
5 DISCUSSION	98
6 REFERENCES.....	109

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Formation de proplaquettes par des mégacaryocytes murins en culture et image de microscopie électronique des plaquettes.....	12
Figure 2. Profil d'agrégation plaquettaire, Western-Blott et résultat de cytométrie en flux caractéristique d'une thrombasthénie de Glanzmann.....	17
Figure 3. Représentation des mutations répertoriées à ce jour au niveau des gènes ITGA2B et ITGB3.....	20
Figure 4. Représentation schématique de la structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	24
Figure 5. Modélisation 3D du domaine β -propeller de la sous-unité α_{IIb}	25
Figure 6. Représentation 3D des sites de coordination des ions métalliques du domaine β -I de la sous unité β_3	28
Figure 7. Représentation 3D des segments transmembranaires des sous-unités α_{IIb} et β_3 et description des différents motifs d'interaction.....	31
Figure 8. Représentation schématique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et des changements de conformation associés à son activation.....	33
Figure 9. Représentation schématique de l'Inside-Out signalling nécessaire à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	36
Figure 10. Représentation schématique des gènes ITGA2B et ITGB3 illustrant le spectre des mutations identifiées dans notre série de patients.....	62
Figure 11. Répartition par types des mutations retrouvées dans ITGA2B et ITGB3.....	63
Figure 12. Étude par HRM de la ségrégation familiale de deux nouvelles mutations présentes à l'état hétérozygote dans ITGA2B.....	63
Figure 13. Effet de la transition c.571T>G mesurée par différentes approches in silico et in vitro.....	68
Figure 14. Analyse in vitro de l'effet pathogène de la mutation c.2348+5G>C identifiée dans ITGA2B chez un patient présentant une TG de type II.....	71
Figure 15. Analyse par cytométrie en flux et Western-Blot de cellules Cos-7 transfectées pour deux nouvelles mutations.....	72
Figure 16. Analyse de l'effet sur l'épissage par une technique de minigène de la délétion c.1440-13_c.1440-1del identifiée dans ITGA2B.....	73
Figure 17. Modélisation 3 D représentant quelques mutations faux-sens présentes dans le domaine β -propeller.....	76
Figure 18. Modélisation statique et dynamique de la mutation G44V dans ITGA2B.....	78
Figure 19. Représentation structurale de trois nouvelles mutations faux-sens identifiées dans le domaine calf-2.....	80
Figure 20. Représentation structurale de certaines mutations faux-sens identifiées dans la partie extra-cellulaire de β_3	82
Figure 21. Alignement de séquences de β_3 à l'aide du logiciel M-Coffee.....	84

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I. Alloantigènes plaquettaires présents sur les gènes ITGA2B et ITGB3.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau II. Données clinico-biologiques des patients inclus dans l'étude.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau III. Mutations identifiées chez les 83 patients</i>	<i>61</i>
<i>Tableau IV. Liste des 22 mutations tronquantes.....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau V. Variations du site d'épissage observées dans cette étude.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau VI. Mutations faux-sens identifiées.....</i>	<i>75</i>

1 INTRODUCTION

Les pathologies plaquettaires d'origine génétique constituent un groupe hétérogène de maladies rares. Elles peuvent aussi bien être responsables d'anomalies de la production des plaquettes (thrombopénie) que de leurs fonctions (thrombopathie). Ces pathologies constituent un modèle pour la compréhension des mécanismes conduisant à l'activation et à la production de ces cellules. Les atteintes spécifiques de certaines protéines ont permis de mieux comprendre par exemple, comment elles étaient capables d'interagir avec le milieu extra-cellulaire ou bien comment elles étaient capables d'être produites correctement.

La pathologie plaquettaire constitutionnelle la plus fréquente et la mieux connue à ce jour reste la thrombasthénie de Glanzmann (TG). C'est une maladie hémorragique héréditaire, liée à une anomalie quantitative ou qualitative du récepteur membranaire plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ impliqué dans l'agrégation des plaquettes [1]. Il s'agit d'une thrombopathie isolée. En effet, le taux de plaquettes est normal dans cette pathologie. La glycoprotéine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est le récepteur plaquettaire du fibrinogène et d'autres molécules d'adhésion, comme le facteur Willebrand, la fibronectine ou la vitronectine [2].

Dans le chapitre qui suit, nous rappellerons brièvement comment les plaquettes sont produites, ainsi que les différentes étapes de l'hémostase primaire conduisant à l'agrégation des plaquettes via le fibrinogène et le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$.

1.1 PLAQUETTES SANGUINES ET HÉMOSTASE PRIMAIRE

1.1.1 Plaquettes

Les plaquettes sont des cellules anucléées provenant de la segmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (Fig. 1). Les mégacaryocytes matures, issus d'un processus d'endo-répliques successives de progéniteurs de la moelle osseuse, vont migrer à l'entrée des vaisseaux sinusoides, et émettre des prolongements cytoplasmiques, qui seront libérées dans la lumière des vaisseaux sous l'effet du flux sanguin, produisant ainsi les plaquettes [3]. De forme discoïde, les plaquettes présentent un cytosquelette très organisé, constitué de nombreux microfilaments et microtubules, leur permettant de changer de forme très rapidement après leur activation. Bien qu'elles n'aient pas de noyau, les plaquettes possèdent la machinerie nécessaire à la synthèse protéique.

Leur cytoplasme renferme des granulations de deux types : les granules α , qui sont les plus nombreux (20 à 200 par cellule), et les granules denses (2 à 10 par cellule). Ces granules contiennent des éléments solubles, qui serviront à l'activation des plaquettes, puis à l'amplification du processus d'hémostase.

Enfin, on retrouve dans les plaquettes, d'autres organelles communes à toutes les cellules : un petit nombre de mitochondries, des lysosomes et des micro-peroxysomes.

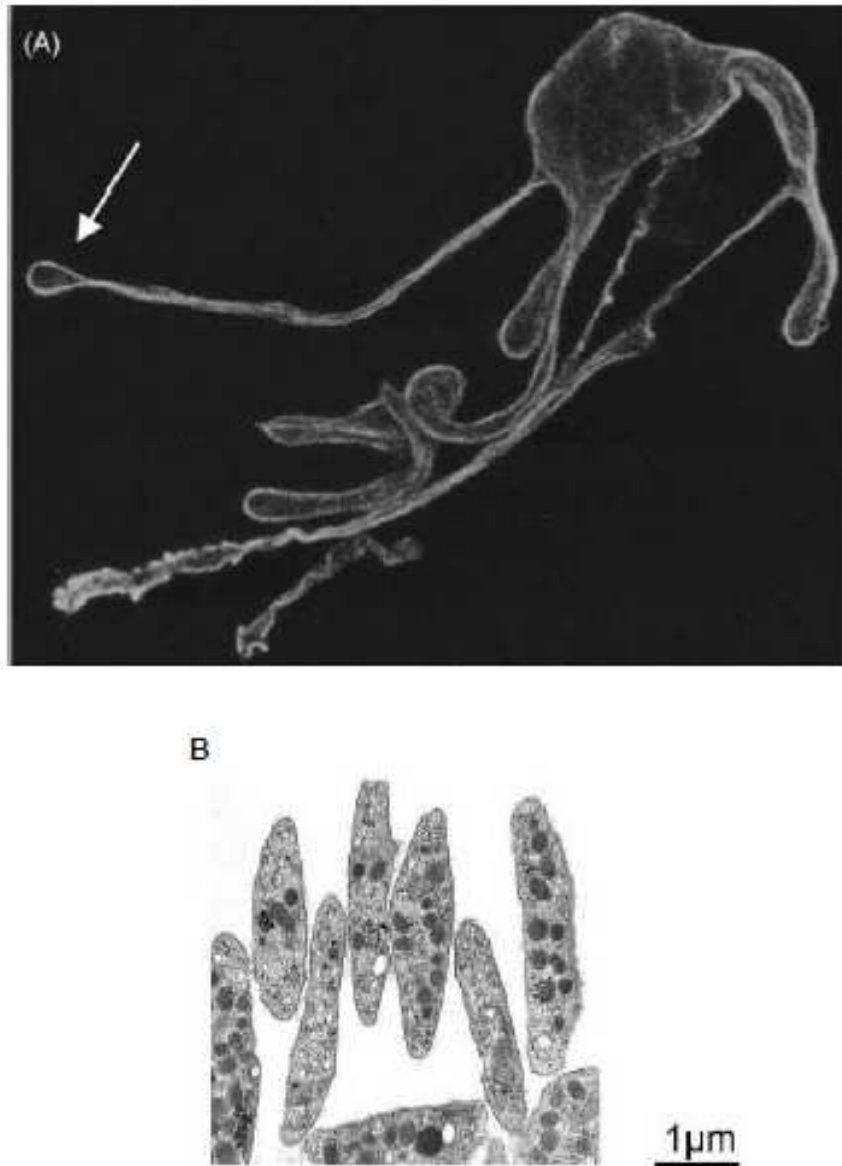


Figure 1. (A) Formation de proplaquettes par des mégacaryocytes murins en culture, révélées par immunofluorescence de la β -tubuline [3]. (B) Image de microscopie électronique des plaquettes. Les plaquettes, de forme discoïde, sont homogènes en taille et leur contenu en granules α est également réparti de manière homogène.

1.1.2 Hémostase primaire

Le processus d'hémostase comprend l'ensemble des phénomènes qui vont permettre l'arrêt d'un saignement après la survenue d'une brèche vasculaire. C'est un phénomène localisé, auto-amplifié et auto-régulé, déclenché par le contact du sang avec certains éléments du sous-endothélium (essentiellement le facteur Willebrand (VWF), les microfibrilles de collagène, le facteur tissulaire...).

Il repose sur trois phases, en théorie successives, mais en réalité intriquées:

- (i) l'hémostase primaire, qui correspond à la formation du clou plaquettaire ;
- (ii) la coagulation, qui aboutit à la formation du caillot de fibrine ;
- (iii) la fibrinolyse qui permet la reperméabilisation du vaisseau après la formation du caillot de fibrine.

Les principaux acteurs de l'hémostase primaire sont: (i) les plaquettes ; (ii) le facteur Willebrand (VWF), le fibrinogène ; (iii) les phospholipides anioniques ; (iv) le calcium ; (v) l'endothélium et le sous-endothélium.

Lorsque survient une brèche vasculaire, une vaso-constriction réflexe se produit, qui va réduire les pertes sanguines en favorisant les interactions plaquettes-endothélium. Ensuite, intervient la formation du clou plaquettaire qui va se faire en trois étapes: l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire.

1.1.2.1 Adhésion

Le VWF joue un rôle majeur dans l'interaction plaquettes-vaisseaux. C'est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, présente sous forme de multimères, synthétisée

par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. Le VWF est stocké dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, où il est sécrété en permanence dans le plasma.

Sa concentration plasmatique peut physiologiquement augmenter dans certaines situations de stress (grossesse, inflammation,...). Lorsque survient une lésion de la paroi d'un vaisseau, les plaquettes vont venir adhérer au sous-endothélium :

- soit par l'intermédiaire du récepteur plaquettaire $\alpha_2\beta_1$ au collagène ;
- soit par l'intermédiaire du récepteur plaquettaire GPIb-IX-V au VWF.

1.1.2.2 Activation

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et la libération d'inducteurs physiologiques tels que l'ADP, l'adrénaline, le thromboxane A_2 ou la thrombine vont déclencher l'activation plaquettaire.

Sous l'influence de ces stimuli, la transduction du signal d'activation induit des modifications biochimiques intra-plaquettaires, dont l'augmentation du calcium cytoplasmique. Cette activation entraîne également des modifications morphologiques des plaquettes qui vont acquérir une forme sphérique et émettre des pseudopodes.

Les principaux récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ vont alors se regrouper à la surface des plaquettes pour former des « clusters » et subir des modifications de conformation, qui vont leur permettre de fixer les molécules de fibrinogène.

1.1.2.3 Agrégation

L'agrégation plaquettaire nécessite du fibrinogène, qui va servir de liaison entre les complexes $\alpha_{IIb}\beta_3$ des différentes plaquettes. Elle est initialement réversible, puis devient

irréversible après consolidation par les molécules libérées des granules (thrombospondine, fibronectine,...).

1.3.2.1 Défaut d'agrégation plaquettaire : la thrombasthénie de Glanzmann

L'absence ou la nette diminution de l'agrégation plaquettaire est la caractéristique principale de la thrombasthénie de Glanzmann (TG). Cette maladie génétique est liée à une anomalie quantitative ou qualitative du récepteur membranaire plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ impliqué dans l'agrégation des plaquettes. Il existe plusieurs types de TG : les types I, II et les variants. Les types I et II présentent des anomalies quantitatives du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dans le type I, le déficit est majeur et le récepteur est absent ou n'est présent qu'à l'état de traces (<5 %) ; dans le type II, le taux résiduel est de l'ordre de 5 % à 20 %. Les formes variantes correspondent essentiellement à des anomalies qualitatives du récepteur, qui est présent à des taux proches de la normale. Dans tous les cas, l'anomalie fonctionnelle est la même et se traduit par l'incapacité des plaquettes à agréger entre elles.

Appartenant au groupe des maladies rares, la thrombasthénie de Glanzmann affecte moins de 500 patients en France (données non publiées). Les signes cliniques faisant évoquer la maladie relèvent [4] :

- Soit d'un syndrome hémorragique spontané : purpura, pétéchies et/ou ecchymoses ; épistaxis (fréquentes chez l'enfant) ; gingivorragies ; ménorragies ; hématuries ; hémorragies gastro-intestinales (plus rares) ou hémorragies intracrâniennes (exceptionnelles).
- Soit d'un syndrome hémorragique provoqué : lésions mineures (plaie de section...) ; hémorragies sévères après interventions chirurgicales ; syndrome hémorragique grave après un accouchement ; hémorragie intracrânienne après un

traumatisme ; hématomes sous-cutanés ou intramusculaires, voire hémarthroses post-traumatiques (rares).

La transmission de la maladie se fait selon un mode autosomique récessif. Seuls les patients homozygotes ou hétérozygotes composites sont symptomatiques. La TG est fréquente au sein de groupes ethniques dans lesquelles il existe une forte consanguinité. En France, il s'agit essentiellement des personnes issues de la communauté des gens du voyage (Manouches) [5-7].

Les anomalies génétiques responsables sont situées au sein de l'un ou l'autre des gènes *ITGA2B* ou *ITGB3*, localisés sur le chromosome 17, et codant respectivement pour les sous-unités α_{IIb} et β_3 [8].

Le diagnostic positif de la maladie repose sur le test d'agrégation plaquettaire réalisé avec différents inducteurs, qui retrouve une absence d'agrégation avec tous les agonistes, même les plus forts [2] (Fig. 2A). La cytométrie en flux et/ou le Western-Blot permettent de mettre en évidence une absence, une diminution ou une anomalie qualitative du complexe membranaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fig. 2B et C). La cytométrie en flux permet également de rechercher une anomalie d'activation du complexe après stimulation des plaquettes, grâce notamment à un anticorps (PAC-1), qui reconnaît spécifiquement le site de fixation du ligand de l'intégrine.

L'étude génétique par biologie moléculaire est systématiquement proposée pour: (i) confirmer le diagnostic de la maladie ; (ii) faciliter la réalisation des études familiales : chez les sujets apparentés et porteurs potentiels (détection des hétérozygotes) ; (iii) aider les patients dans le choix d'un projet parental : diagnostic prénatal.

Le traitement de la maladie repose essentiellement, en cas de syndrome hémorragique grave ou de chirurgie, sur les transfusions plaquettaires.

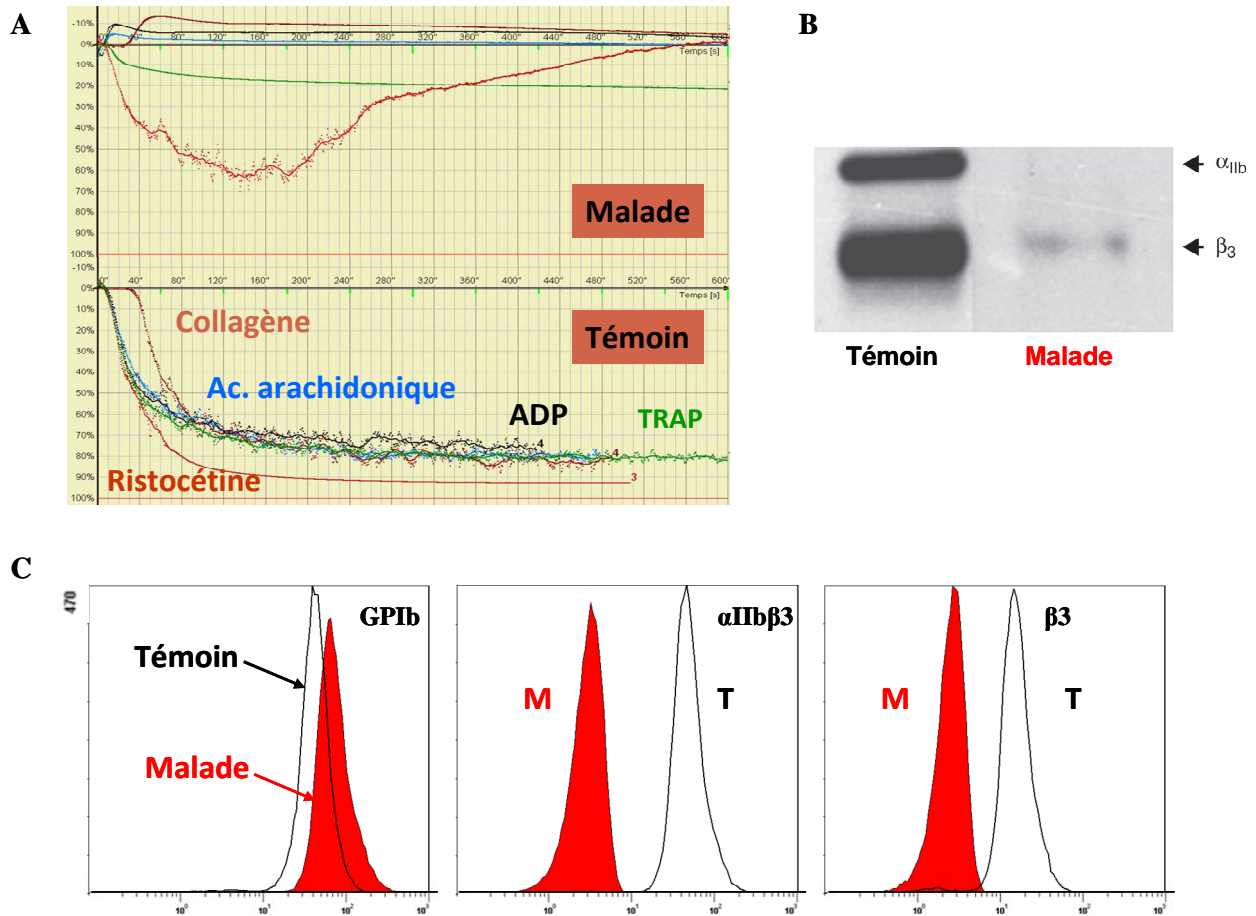


Figure 2. A) Profil d'agrégation plaquettaire caractéristique d'une thrombasthénie de Glanzmann retrouvant un défaut d'agrégation avec les principaux agonistes ; B) Résultat d'un Western-Blott retrouvant une absence des deux sous-unités chez le malade ; C) Défaut d'expression du complexe à la surface des plaquettes mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps monoclonaux reconnaissant différents épitopes. À noter une expression normale de la sous-unité GPIIb, qui n'est pas affectée dans cette maladie (contrôle interne).

1.2 INTÉGRINE $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

La glycoprotéine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ appartient à la famille des intégrines, qui sont des récepteurs de répartition ubiquitaire dans l'organisme. Les intégrines permettent l'adhésion cellule/cellule et cellule/matrice. Elles jouent un rôle important dans la migration, la prolifération [9], la différenciation [10] et la survie cellulaire [11]. Elles sont également impliquées dans un certain nombre de pathologies telles que les néoplasies et la dissémination métastatique [12], la dysimmunité [13], l'ischémie-reperfusion [14], ou encore l'hémostase et la thrombose [15].

On compte environ 100 000 récepteurs $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ présents à la surface des plaquettes, auxquels viennent s'ajouter, après activation plaquettaire, une quantité équivalente, contenue dans les membranes internes de la cellule [16]. Le récepteur $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ est relié au cytosquelette, et principalement à l'actine. Lorsque les plaquettes s'activent, ce complexe est capable de se fixer au fibrinogène, mais aussi à d'autres protéines adhésives comme la fibronectine, la vitronectine, ou le facteur Willebrand. Ces quatre molécules ont une séquence peptidique commune (Arginine-Glycine-Acide aspartique-Serine = RGDS), par laquelle elles sont reconnues.

1.2.1 Gènes *ITGA2B* et *ITGB3*

1.2.1.1 Structure, expression et modifications post-traductionnelles

Les gènes *ITGA2B* et *ITGB3* codent respectivement pour les chaînes α_{IIb} et β_3 du complexe. Ils sont tous les deux situés sur le bras long du chromosome 17. Ils s'étendent respectivement sur 17 kb et 90 kb. En dehors de cette proximité génomique, il n'y a pas

d'expression coordonnée de ces deux gènes. Le gène *ITGA2B* comprend 30 exons, alors que le gène *ITGB3* en compte 15. Ces deux gènes sont très polymorphes, et portent à eux deux, 21 antigènes plaquettaires humains (Tableau I).

Alors que le gène *ITGA2B* n'est exprimé que dans la lignée mégacaryocytaire, le gène *ITGB3* a une expression tissulaire plus diverse. En effet, la sous-unité β_3 peut s'associer à la sous-unité α_v pour former le récepteur de la vitronectine.

L'expression des deux gènes apparaît précocement au cours de la mégacaryocytopoïèse. La sous-unité α_{IIb} est d'abord synthétisée sous la forme d'un pro-peptide (forme immature, pro- α_{IIb}) avant de subir des modifications post-traductionnelles conduisant au clivage de la sous-unité en une chaîne lourde et une chaîne légère reliées entre-elles par un pont disulfure (forme mature, α_{IIb}) [17]. Ces deux entités peuvent être facilement distinguées par leur taille sur un western-blot après rupture des ponts disulfures.

La formation du complexe apparaît précocement après la synthèse de chaque sous-unité, celles-ci étant liées de manière non-covalente. Chaque sous-unité subit alors une série de O- et N- glycosylations dans le réticulum endoplasmique, puis dans l'appareil de Golgi. Le complexe est ensuite exprimé à la surface des plaquettes, mais un contingent est également présent dans les granules α .

1.2.1.2 Spectre mutationnel des gènes *ITGA2B* et *ITGB3*

À ce jour, environ 200 mutations différentes responsables de TG ont été identifiées (Fig. 3), réparties de manière diffuse sur les deux gènes (<http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>). Soixante pourcent d'entre-elles correspondent à des mutations d'insertion/délétion, des anomalies de l'épissage, ou

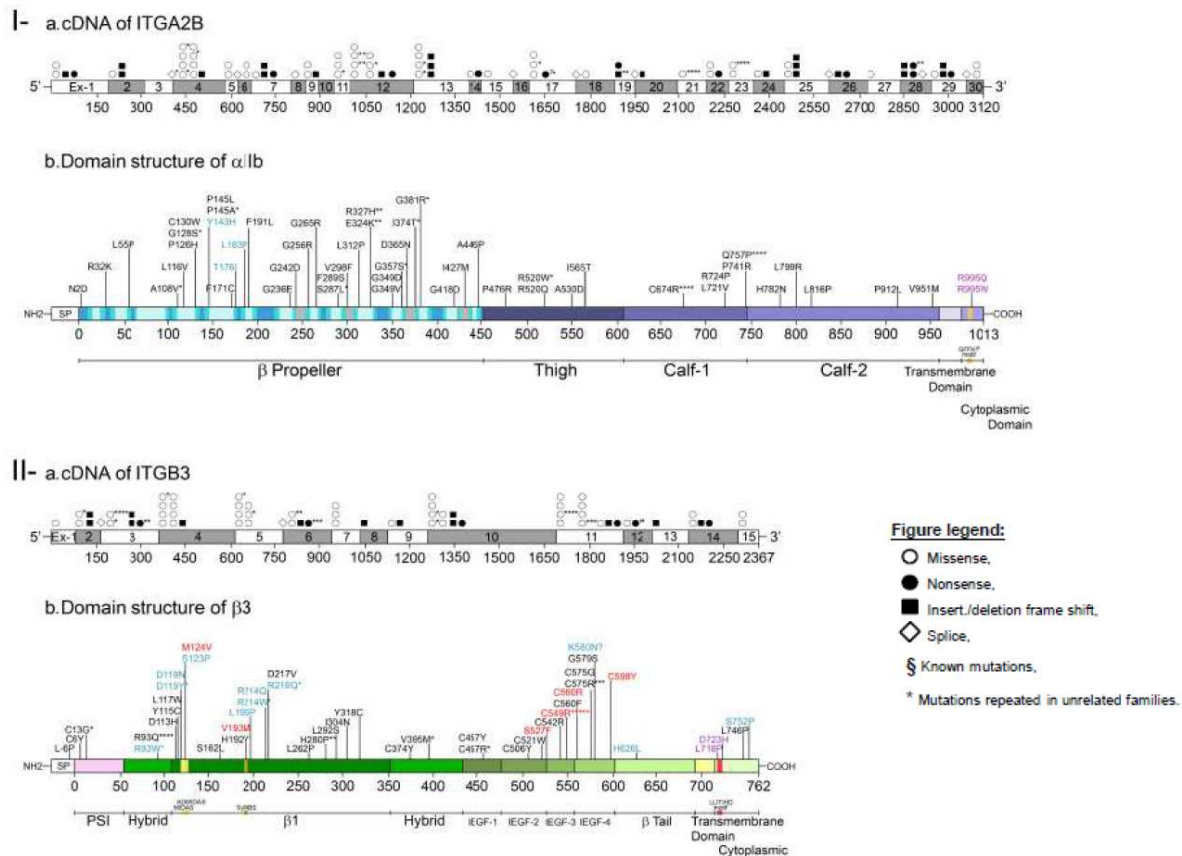


Figure 3. Représentation des mutations répertoriées à ce jour au niveau des gènes *ITGA2B* et *ITGB3* (D'après, Nurden AT, 2012).

des mutations non-sens. Soixante-dix pourcent des mutations faux-sens identifiées concernent environ un tiers des 45 exons codant pour le complexe.

Les anomalies moléculaires décrites dans la littérature montrent que celles-ci peuvent avoir des conséquences variables sur l'expression ou la fonction du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ainsi, une classification de ces anomalies par rapport au type de déficit observé peut être proposée.

Mutations altérant la production de la protéine. Ces mutations entraînent une diminution très importante voire une absence totale d'expression de la protéine au sein des plaquettes. Ce type inclut essentiellement les mutations non-sens et les mutations induisant

Tableau I. Alloantigènes plaquettaires présents sur les gènes *ITGA2B* et *ITGB3*.

Antigènes	Gènes	Glycoprotéine	Variant (ADNc)	Variant (Protéine)	References
HPA-22bw	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.584A>C	p.K195T	Peterson et al. Transfusion (2012)
HPA-24bw	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.1508G>A	p.S503N	Jallu et al. Transfusion (2011)
HPA-20w	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.1949C>T	p.T650M	Peterson et al. Transfusion (2009)
HPA-28bw	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.2311G>T	p.V771L	Poles et al. published online (2013)
HPA-9w	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.2602G>A	p.V868M	Noris et al. Blood 86:1019-26 (1995)
HPA-27bw	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.2614C>A	p.L872M	Jallu et al. Transfusion (2013)
HPA-3	<i>ITGA2B</i>	α IIb	c.2621T>G	p.I874S	Lyman et al. Blood 1990, 75:2343-8 (1990)
HPA-1	<i>ITGB3</i>	β 3	c.176T>C	p.L59P	Newman et al. J Clin Invest 83:1778-81 (1989)
HPA-10w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.263G>A	p.R88Q	Peyruchaud et al. Blood 89:2422-28 (1997)
HPA-16w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.497C>T	p.T166I	Jallu et al. Blood 99:4449-56 (2002)
HPA-19w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.487A>C	p.K163Q	Peterson et al. Transfusion (2009)
HPA-4	<i>ITGB3</i>	β 3	c.506G>A	p.R169Q	Wang et al. Proceedings of the Japan Academy 67:102-6 (1991)
HPA-17w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.662C>T	p.T221M	Stafford et al. Transfusion 48:1432-38 (2008)
HPA-7w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1297C>G	p.P433A	Kuijpers et al. Blood 81:70-8 (1993)
HPA-6w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1544G>A	p.R515Q	Wang et al. Blood 82:3386-91 (1993)
HPA-26bw	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1818G>T	p.K606N	Sachs et al. Thromb Haemost (2012)
HPA-14w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1909_1911delAAG	p.K637del	Santoso et al. Blood 99:1205-14 (2002)
HPA-21w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1960G>A	p.E854K	Peterson et al. Transfusion (2009)
HPA-23bw	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1942C>T	p.R648W	Peterson et al. Transfusion (2012)
HPA-11w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1976G>A	p.R659H	Simsek et al. Br J Haematol 97:330-335 (1997)
HPA-8w	<i>ITGB3</i>	β 3	c.1984C>T	p.R662C	Santoso et al. J Biol Chem 269:8439-44 (1994)

l'apparition d'un codon stop prématuré par introduction d'un décalage du cadre de lecture ou frame-shift (anomalies de l'épissage ou insertion/délétion). L'ARNm muté synthétisé est instable et rapidement dégradé, sans qu'aucune synthèse protéique ne soit possible. Dans d'autres cas, c'est la protéine anormale produite (mutations faux-sens) qui est instable et rapidement dégradée.

Mutations perturbant les modifications post-traductionnelles et/ou le transport intracellulaire de la protéine. De nombreuses mutations altèrent la maturation de la protéine et/ou son ciblage vers la membrane plaquettaire. Après formation du complexe, chaque sous-unité subit une série de O- et N- glycosylations, survenant dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. En cas de mutations altérant ces modifications, le complexe est retenu dans l'un de ces deux organelles. Ainsi, la protéine est soit absente à la membrane, soit présente, mais en quantité très réduite.

Mutations perturbant la fonction de l'intégrine. Ces mutations, qui sont les plus rares, sont le plus souvent situées dans les domaines de liaison du ligand. Les mutations faux-sens situées dans ces régions produisent une protéine quantitativement subnormale, mais ayant une activité perturbée, empêchant les plaquettes d'agréger entre-elles.

1.2.1.3 Particularités des mutations du site d'épissage

L'épissage exige des séquences conservées, dites « consensus », aux jonctions exon-intron, ainsi que divers éléments régulateurs exoniques et introniques. Certaines mutations pathogènes peuvent perturber l'épissage normal, entraînant une perte de fonction de l'allèle concerné. Une erreur d'épissage avec une insertion ou une délétion d'un ou plusieurs nucléotides peut perturber le cadre de lecture de l'ARNm. C'est le cas par exemple de la mutation « gitane » particulièrement fréquente en France.

1.2.1.4 Mutation gitane

La mutation la plus commune en France est une mutation du site d'épissage (c.1544+1G>A) située dans l'intron 15 du gène *ITGA2B*. Elle est responsable d'un épissage anormal survenant 8 pb en amont dans l'exon 15 [18, 19]. Cette mutation est associée à une forme de type I de la maladie. Tous les patients atteints de TG issus de la communauté des Manouches portent cette même mutation à l'état homozygote [5, 7].

1.2.2 Structure du complexe

Cet hétéro-dimère est constitué de deux sous-unités : α_{IIb} et β_3 , liées entre-elles de manière non-covalente. On y distingue un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire, et un court domaine intra-cytoplasmique, impliqué dans l'interaction avec les protéines du cytosquelette [20] (Fig. 4).

1.2.2.1 Domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire du complexe comprend la majorité des acides aminés de chaque sous-unité. Il est constitué de plusieurs sous-domaines comprenant deux « têtes » globulaires, impliquées dans la liaison du ligand et portées par deux longues « jambes ».

Sous-unité α_{IIb}

La partie extra-cellulaire de la sous-unité α_{IIb} se compose d'un domaine appelé « β -propeller », un domaine « thigh » et deux domaines « calf » [21, 22].

Le domaine β -propeller est constitué de différents feuillets β , organisés en pales d'hélice (au nombre de 7). Chaque pale d'hélice, ou « blade », est elle-même composée de quatre feuillets β anti-parallèles adoptant une topologie en W (Fig. 5) [22]. Deux anneaux concentriques de résidus, principalement aromatiques, tapissent le bord intérieur et supérieur de l'hélice, constituant un motif appelé « cage » qui accueille l'arginine 261 de la sous-unité β_3 [23]. Les boucles reliant les différents feuillets β s'étendent au-dessus ou en-dessous du plan de l'hélice (Fig. 5). Les boucles supérieures portent des motifs répétés « FG-GAP », communs à toutes les sous-unités α des intégrines et essentiels à la

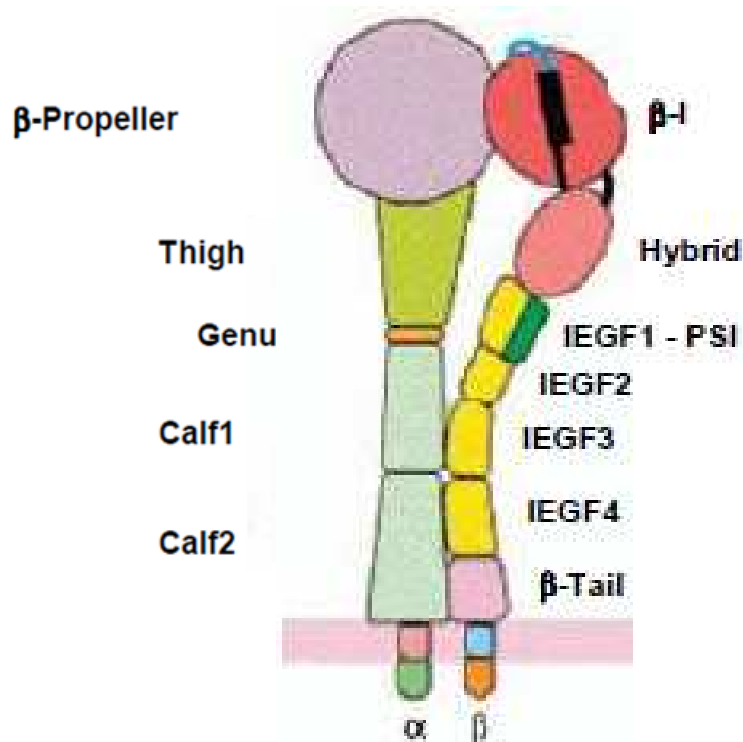


Figure 4. Représentation schématique de la structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [24].

stabilisation de la structure de chaque « blade » (Fig. 5) [25]. À l'opposé de ces motifs, quatre sites de liaison du Ca^{2+} sont retrouvés entre les « blades » 4 et 7 (Fig. 5 E,H) [21]. Les données des structures cristallines des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ montrent que ces domaines décrivent des boucles de type β -hairpin, constituées par une boucle chargée avec une charnière de glycine, flanquée par des résidus hydrophobes. Ces sites de liaison du Ca^{2+} comprennent une séquence consensus de neuf résidus : D/E-D- Φ /N-X-D/N-G- Φ -X-D/E (" Φ ", décrivant des résidus hydrophobes). L'ion Ca^{2+} présente des liaisons de coordination avec les atomes d'oxygène des chaînes latérales des résidus 1, 3, 5 et 9 et l'oxygène de la fonction carbonyle du résidu 7.

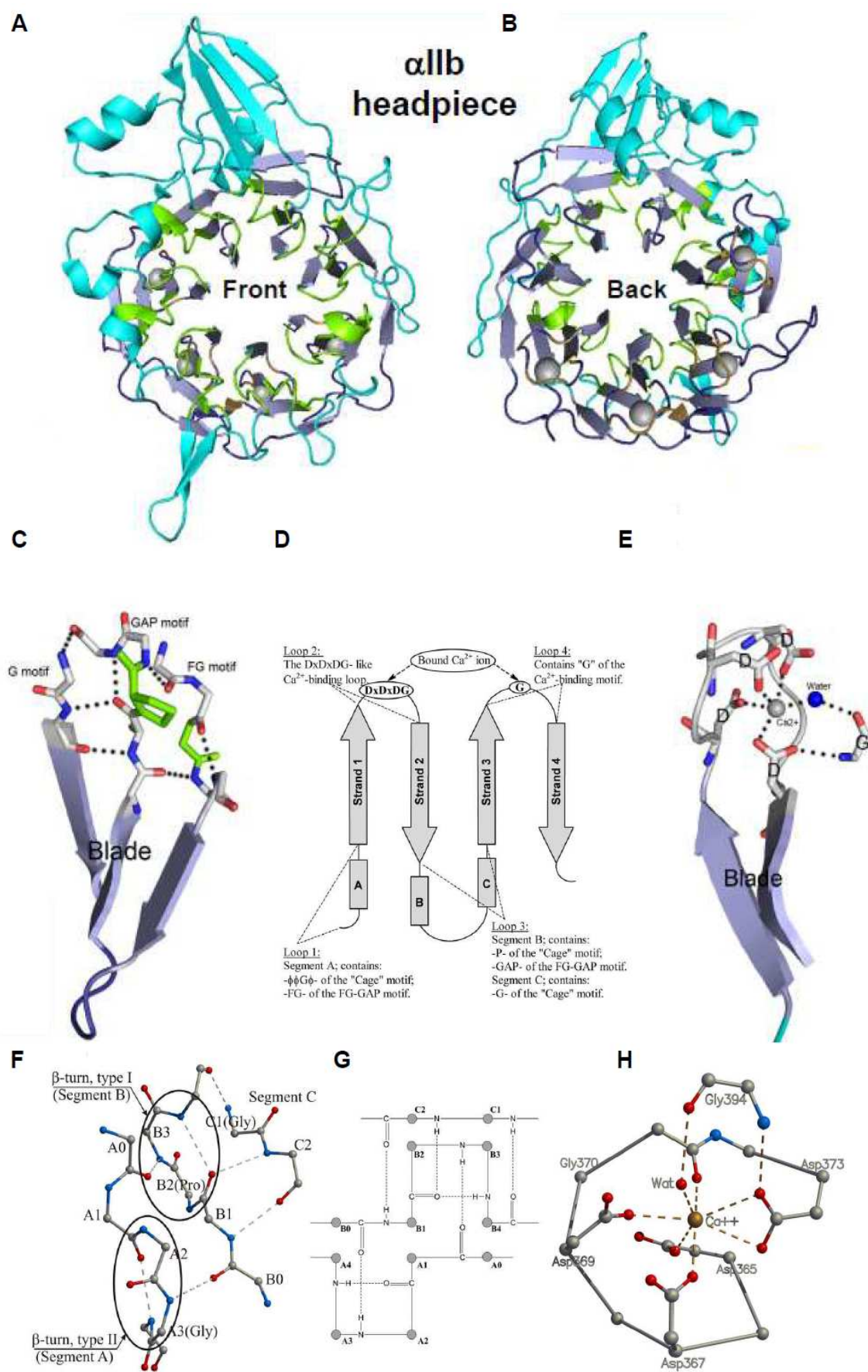


Figure 5

Figure 5. Modélisation 3D du domaine β -propeller de la sous-unité α_{IIIb} , vue de face (région en contact avec le domaine β -I de la sous unité β_3) (A) et de dos (B). Les feuillets β constituant les « blades » sont représentés en bleu avec, en bleu clair, les régions en contact de β_3 et les régions opposées, en bleu foncé. Les motifs FG-GAP sont représentés en vert et les motifs de coordination du Ca^{2+} en marron, les sphères grises représentant les ions Ca^{2+} . (D) Schéma de la structure d'un « blade » avec ses quatre feuillets β anti-parallèles et sa topologie en W. Les segments A, B et C, adjacents aux feuillets β_1 , 2 et 3, contiennent les acides aminés essentiels à la constitution des motifs 'cage' et FG-GAP. Le motif de liaison du calcium, retrouvé au niveau des blades 4 à 7, est également représenté. Il est présent au niveau des boucles reliant les feuillets β_1 - β_2 et β_3 - β_4 . (C, E) Modélisation 3D des structures formant le domaine FG-GAP et le motif de liaison du Ca^{2+} . Les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans des liaisons hydrogènes (H) sont représentées en forme de 'bâtonnet' et les liaisons H sont formalisées par des lignes pointillées ; le Ca^{2+} étant représenté par une sphère grise. Les atomes d'oxygène des molécules d'eau, engagées dans les liaisons H, sont représentés par une petite sphère bleue ; Représentations 3D (F) et schématiques (G) des segments A, B et C portant les acides aminés des motifs 'cage' et FG-GAP. Les trois segments interagissent par l'intermédiaire d'un réseau de liaisons hydrogènes spécifiques qui sont identiques pour tous les « blades » du domaine β -propeller. Ces trois segments présentent en outre une structure secondaire conservée, où les segments A et B contiennent des β -turn de type II et I, impliquant des résidus Gly et Pro. Le réseau de liaisons hydrogènes, associé au motif de liaison du calcium, créent une structure extrêmement compact. (H) Représentation 3D du motif de liaison du calcium. Pour chaque « blade » ayant un motif de liaison du calcium (DxDxDG), les chaînes latérales des acides aminés de la boucle reliant les brins 1 et 2, et les atomes de la chaîne latérale d'un acide aspartique ou d'une glycine, vont être impliqués dans la coordination de celui-ci [25].

Sous-unité β_3

Dans sa partie extra-cellulaire, la sous-unité β_3 est composée des domaines β -I, PSI (pour plexin/semaphorin/intégrine), du domaine hybrid, et de quatre motifs répétés EGF (Fig. 4). Le domaine β -I comprend six feuillets β centraux, entourés de huit hélices α . Il contient un réseau linéaire de sites liant des ions métalliques : le site MIDAS ('metal ion

dependent adhesion site') au centre, flanqué de deux autres sites, les sites SyMBS (Synergistic Metal ion-Binding Site) et ADMIDAS (adjacent to MIDAS) (Fig. 6).

Le domaine MIDAS contient un motif D-X-S-X-S, essentiel à la coordination de l'ion métallique et à la liaison du ligand. Il est formé des acides aminés suivants : D119, S121, S123, E220 et D251 (Fig. 6) [21]. Les différentes études de structure 3D réalisées ont montré que le groupe carboxyle du résidu aspartique de la séquence RGD du ligand est en coordination avec le Mg^{2+} du domaine MIDAS [26].

Dans la conformation de faible affinité de l'intégrine, le Ca^{2+} du site ADMIDAS interagit avec l'oxygène de la fonction carbonyle de la méthionine 335, elle-même impliquée dans la liaison peptidique de la boucle $\beta 6-\alpha 7$ (Fig. 6). Cette interaction empêche l'éloignement de l'hélice $\alpha 7$ et stabilise ainsi l'intégrine

Le site SyMBS est lui aussi important, mais n'est pas absolument nécessaire à l'activation de l'intégrine. Il est considéré comme un site de régulation positive de la liaison du ligand. L'ion métallique du site SyMBS forme une interaction de type cation- π avec un résidu aromatique conservé de la boucle de détermination de spécificité (SDL) (Fig. 6). Cette interaction contribue d'une part, à stabiliser la coordination de l'ion métallique du site SyMBS et d'autre part, à assurer la bonne conformation de la boucle SDL [27].

Finalement, le ligand de l'intégrine $\alpha_{IIB}\beta_3$ se fixe au niveau d'un sillon formé par l'association des deux sous-unités, où il interagit avec le motif MIDAS de la sous-unité β_3 et le domaine β -propeller de la sous-unité α_{IIB} .

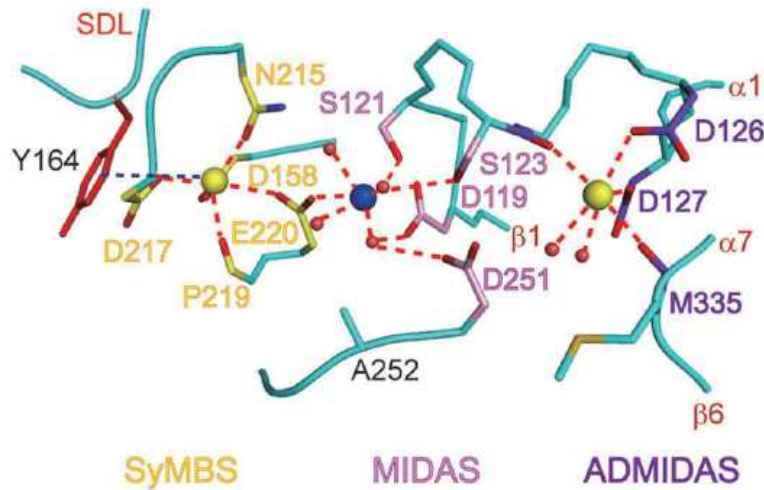


Figure 6. Représentation 3D des sites de coordination des ions métalliques du domaine β -I de la sous unité β_3 . Les sites de liaison des ions métalliques du domaine β -I sont colorés de la manière suivante: jaune, SyMBS, rose, MIDAS et bleu-violet, ADMIDAS. L'ion Mg^{2+} du site MIDAS est représenté sous la forme d'une grande sphère bleue. Les ions Ca^{2+} des sites SyMBS et ADMIDAS sont représentés sous la forme de grandes sphères jaunes. Les atomes d'oxygène des molécules d'eau engagés dans les liaisons de coordination sont représentés sous la forme de petites sphères rouges. Les atomes N et O impliqués dans des liaisons de coordination avec les ions métalliques sont représentés respectivement en bleu et rouge. Les liaisons de coordination sont représentées par des lignes pointillées rouges. L'interaction cation- π entre la chaîne latérale aromatique de la tyrosine 164 de la boucle SDL de β_3 et le Ca^{2+} du site SyMBS est représentée par une ligne pointillée bleue [27].

1.2.2.2 Domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire de l'intégrine est composé d'acides aminés qui forment deux hélices s'enroulant l'une sur l'autre lors de leur hétéro-dimérisation [28].

Contrairement au domaine extracellulaire, aucune image de diffraction des rayons X n'est disponible pour la partie transmembranaire du complexe et une grande partie des données actuellement disponibles le sont sur la base d'analyses par RMN [28-31].

Le segment transmembranaire de la sous-unité α_{IIb} est formé d'une hélice de 24 résidus, suivi d'une inclinaison de celle-ci induite par une inversion du squelette [29]. Le segment transmembranaire de la sous-unité β_3 est formé d'une hélice de 30 résidus. Cette hélice est un peu plus longue que l'épaisseur d'une bicouche lipidique, conduisant à une implantation avec une forte inclinaison au sein de la membrane plasmique [30].

À l'état de repos, les segments transmembranaires des deux sous-unités interagissent pour former un complexe bispiralé. Cette interaction fait notamment intervenir un motif canonique de dimérisation de type GXXXG (Fig. 7A) [32]. Un second motif très conservé et également impliqué dans l'association des deux segments transmembranaires fait lui intervenir le tryptophane en position 713 de la sous-unité β_3 et deux phénylalanines consécutives en position 992 et 993 de la sous-unité α_{IIb} . Ce motif consiste en une interaction de type π par empilement de cycles aromatiques (Fig. 7B).

1.2.2.3 Domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est de très petite taille et peu structuré. Comme le domaine transmembranaire, aucune donnée de cristallographie n'est disponible à l'heure actuelle, et la majorité des informations concernant sa structure tridimensionnelle sont issues d'expérimentations par RMN [33-37].

Les motifs conservés GFFKR de la sous-unité α_{IIb} et HDR(R/K)E de la sous-unité β_3 , situés à proximité immédiate des segments transmembranaires, forment un pont salin

entre l'arginine de la sous-unité α_{IIb} et l'acide aspartique de la sous-unité β_3 [28, 38] (Fig. 7B). L'abolition de ce pont salin conduit à un état spontanément actif de l'intégrine [39, 40].

L'extrémité C-terminale de β_3 possède deux autres motifs conservés bien définis: le motif NPxY situé à proximité de la membrane, et le motif NxxY plus distale (Fig. 7C). Ces motifs constituent des séquences canoniques de phosphorylation de tyrosine [41] et sont également des sites de liaison pour de multiples protéines, tels que la taline et les kindlines.

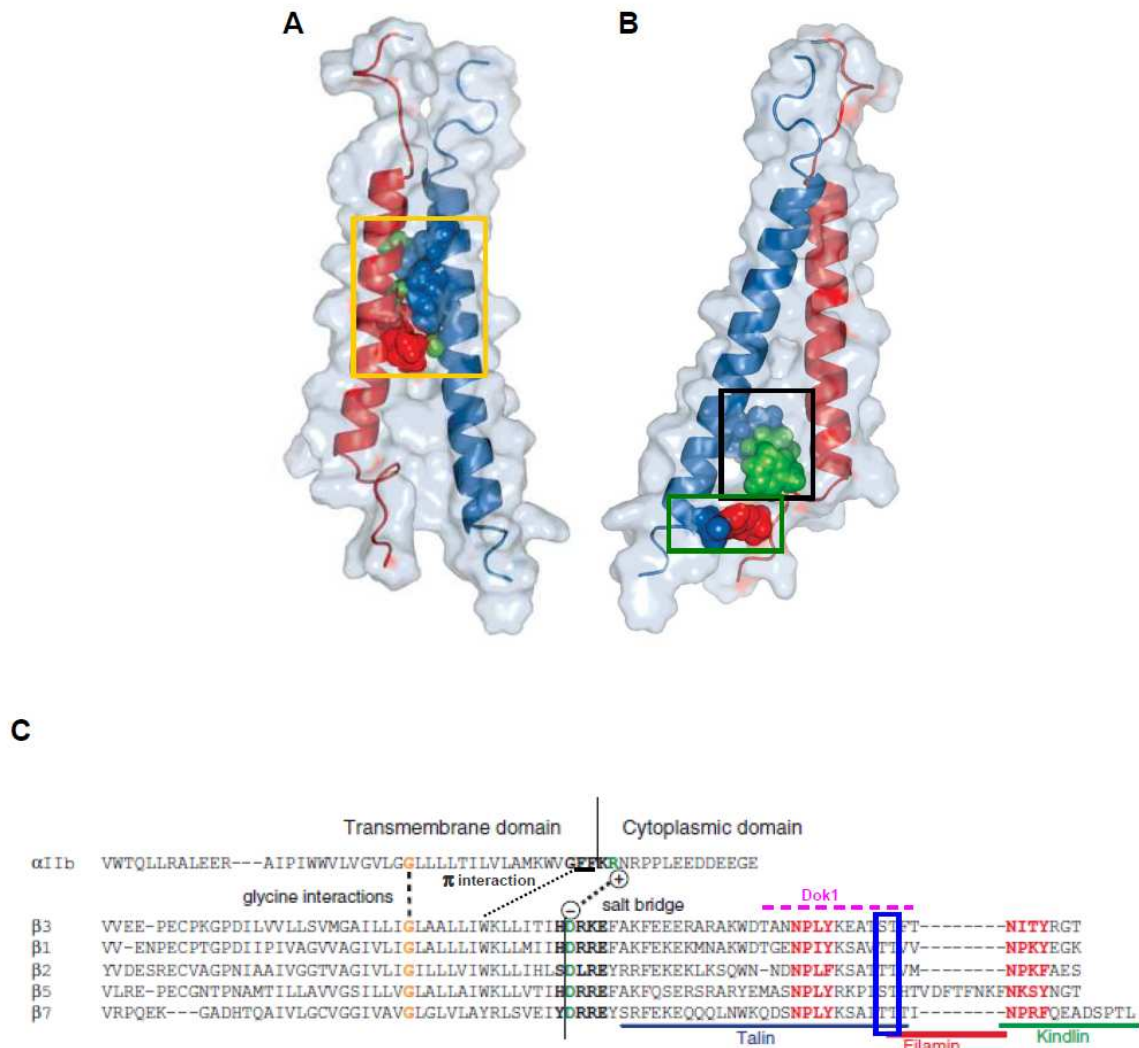


Figure 7. (A, B) Représentation 3D des segments transmembranaires des sous-unités α_{IIb} et β_3 , et description des différents motifs d'interaction : 1) motif de dimérisation GXXXG (A, encadré en jaune) ; 2) interaction π entre le Trp713 de la sous-unité β_3 et les deux Phe (992 et 993) de la sous-unité α_{IIb} (B, encadré en noir) ; et 3) formation d'un pont salin entre l'Asp723 de β_3 et l'Arg995 d' α_{IIb} (B, encadré en vert) [31] ; (C) Représentation des différentes interactions des segments transmembranaires (même code couleur que précédemment) et des différents partenaires intracellulaires conduisant à l'activation de l'intégrine [42].

1.2.3 Fonctions de l'intégrine

Grâce à ses interactions avec le cytosquelette, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ contrôle de nombreuses voies de signalisation intra-cellulaire. Cependant, son degré d'activation est modulé par sa conformation. Á l'état de repos, elle est en position inactive, de basse affinité pour son ligand, puis elle va s'activer suite à un signal intra-cellulaire, conduisant à l'acquisition d'une conformation de haute affinité.

1.2.2.1 Inside-Out signaling

Á l'état de repos, la partie extracellulaire de l'intégrine présente une conformation repliée. Des signaux d'activation intra-cellulaire vont alors conduire à son redressement, puis dans un second temps, à la stabilisation de cette conformation étendue (Fig. 8). Ces modifications de structure s'accompagnent également d'un changement du site de liaison du ligand qui va passer d'une conformation fermée, de faible affinité, à une conformation ouverte, de haute affinité. La fixation du ligand conduit alors à la transmission de signaux allant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Les modifications exactes qui se produisent au niveau de la partie la plus terminale de l'intégrine, afin qu'elle adopte une conformation de haute affinité, ne sont pas totalement connues.

Deux modèles de changement de conformation ont été proposés. Dans le modèle dit du "cran d'arrêt" [43], seule la forme étendue de l'intégrine est capable de se lier au ligand. Á l'opposé, dans le modèle dit "de la serrure à pêne dormant" [44], le changement conformationnel de l'intégrine ne se produit qu'après la liaison du ligand. Dans les deux cas, le changement de conformation du complexe renforce l'affinité du ligand pour l'intégrine [43, 45].

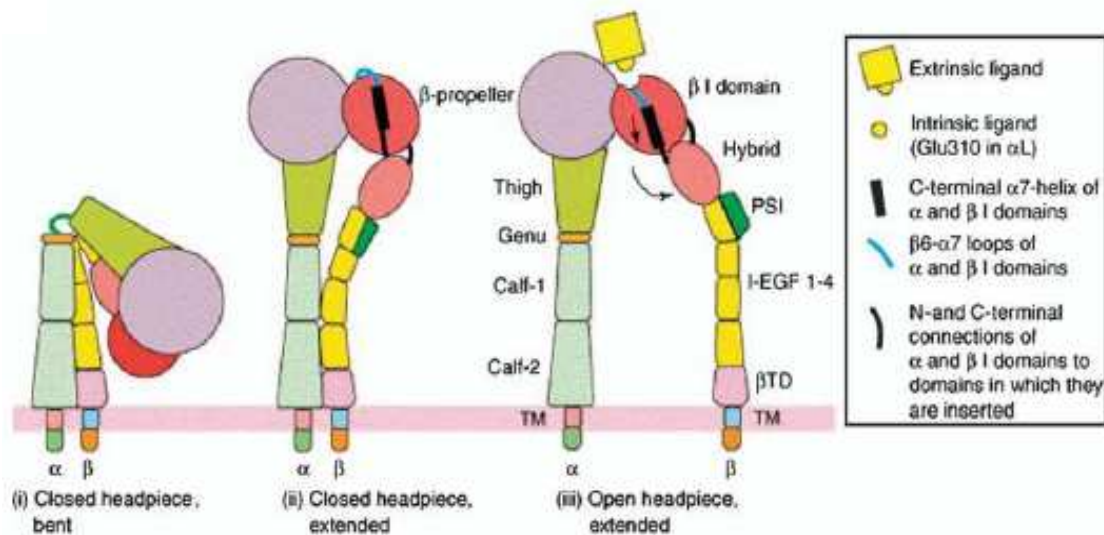


Figure 8. Représentation schématique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et des changements de conformation associés à son activation [46].

l'intégrine. En effet, la séparation des deux segments traversant la membrane est nécessaire à l'adoption d'une conformation de haute affinité de l'intégrine. Plusieurs modèles ont ainsi été proposés. Dans le modèle dit du "piston", un mouvement de glissement vertical des segments transmembranaires provoquerait le changement de conformation, tandis que dans le modèle dit des "ciseaux", il y aurait un basculement, entraînant un écartement de l'angle formé entre les deux segments. Enfin, un troisième modèle a été décrit dans lequel il y aurait une séparation et une individualisation des deux segments transmembranaires.

Quelque soit le modèle impliqué, les modifications d'interaction entre les deux segments transmembranaires conduisent à des changements de conformation des domaines extracellulaires et/ou cytoplasmiques [42]. Notamment, le rôle joué par la partie intracytoplasmique de l'intégrine dans la régulation de son affinité pour le ligand a été bien

étudié [47]. Ainsi, il a été montré qu'un grand nombre de protéines du cytosquelette, et de la signalisation intracellulaire, était capable de se lier au domaine cytoplasmique de l'intégrine. Parmi elles, la taline et les kindlines, en se liant à la sous-unité β_3 , jouent un rôle important dans la séparation des segments transmembranaires et l'éloignement des domaines cytoplasmiques des deux sous-unités. La phosphorylation de la tyrosine du motif NPxY, proximale à la membrane de la sous-unité β_3 , est nécessaire à la liaison de la taline [41]. Une seconde tyrosine, appartenant au motif NxxY, distale à la membrane, est impliquée dans la liaison de la kindline [48-50].

1.2.2.2 Outside-In signaling

Les intégrines n'ont pas d'activité catalytique intrinsèque. Cependant, la liaison du ligand à sa partie extracellulaire entraîne la transduction d'un signal intracellulaire qui a la capacité de moduler la croissance cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Le mécanisme de cette signalisation est complexe et croise celui d'autres récepteurs, comme les récepteurs des facteurs de croissance. Le déclenchement de ces signaux intracellulaires va principalement dépendre de la constitution de complexes d'adhésion focale, complexes macroprotéiques impliquant parfois plus de 150 protéines intracellulaires différentes [51].

La formation de ces complexes constitue la plaque tournante de la transmission des signaux intracellulaires. Ainsi, les protéines impliquées sont en constant flux d'association et de dissociation et, à l'origine de cascades de signalisations complexes (Fig. 7). Trois processus, directement issus de l'activation des intégrines, ont été identifiés. Ce sont : *i*) la constitution et la croissance des points focaux avec le regroupement des intégrines ; *ii*) la polymérisation de l'actine et la contraction du cytosquelette ; *iii*) et enfin, la modulation de la signalisation intracellulaire.

Points focaux et assemblage du cytosquelette d'actine

La liaison du ligand conduit au regroupement des intégrines au sein de la membrane plasmique, et à la constitution de points serrés d'adhésion focale qui favorise l'assemblage des filaments d'actine. Les filaments d'actine sont alors réorganisés en grandes fibres de stress conduisant à une augmentation du regroupement des intégrines et au renforcement des liaisons à la matrice extracellulaire [52]. La liaison avec le cytosquelette d'actine permet une régulation de la croissance des points focaux, et un changement coordonné de forme des plaquettes. Plusieurs protéines clés sont impliquées dans la formation et le maintien de la liaison au cytosquelette. Celles-ci sont de 4 types : *i)* les protéines de liaison directe (taline, α -actinine, filamine), *ii)* les protéines liant les intégrines, mais qui ne se lient qu'indirectement au cytosquelette (kindlines, integrin linked kinase (ILK), paxillin, FAK), *iii)* les protéines liant l'actine, mais pas les intégrines (vinculine), et enfin, *iv)* les protéines adaptatrices ou molécules de la messagerie intracellulaire régulant les interactions décrites précédemment.

Polymérisation de l'actine et contraction du cytosquelette

La liaison de l'intégrine à l'actine est nécessaire à la régulation de la polymérisation de cette dernière, ainsi qu'au contrôle global des mouvements du cytosquelette. Les mécanismes sous-jacents de ce fonctionnement ne sont pas tout à fait connus. Cependant, les points focaux contiendraient la machinerie nécessaire à la polymérisation de l'actine [53], avec (i) le complexe Arp2/3, qui commande l'assemblage des filaments d'actine en un réseau ramifié au niveau des lamellipodes et (ii) la GTPase Rho, qui joue un rôle clé dans la régulation globale de la dynamique de l'actine.

Outside-In signaling et 'cross-talk' avec les récepteurs des facteurs de croissance dans la modulation des voies de signalisation intracellulaires

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue un rôle clé dans l'activation des plaquettes car elle est capable d'engager une signalisation secondaire à la liaison des éléments de la MEC (Outside-In signaling). Les voies de signalisation alors déclenchées sont extrêmement complexes. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ peut également interagir avec les récepteurs des facteurs de croissance et est, pour certains, nécessaire à leur bon fonctionnement [54].

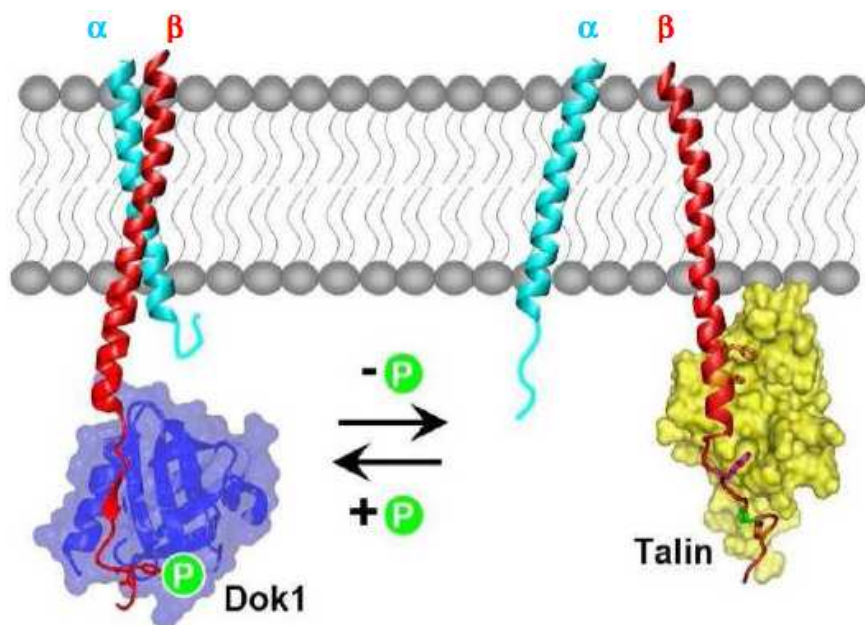


Figure 9. Représentation schématique de l'Inside-Out signalling nécessaire à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. La liaison de la taline au niveau de la phospho-tyrosine du motif NPLY intracytoplasmique de la sous-unité β_3 conduit à l'activation de l'intégrine. La liaison avec d'autres protéines, comme Dok1, peut être observée dans la conformation fermée. La déphosphorylation de β_3 peut conduire au remplacement de Dok1 par la taline et ainsi, entraîner l'activation de l'intégrine [42, 55].

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre travail a consisté en deux objectifs principaux. Le premier était d'étendre, à partir d'une large série de patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann, le spectre mutationnel de cette maladie. Le second était d'établir une éventuelle corrélation entre le génotype de ces patients et leur phénotype clinique.

2.1 SPECTRE MUTATIONNEL DES GÈNES *ITGA2B* / *ITGB3* ET RELATION STRUCTURE-FONCTION DE LA PROTÉINE $\alpha_{IIb}\beta_3$

En dehors du bénéfice propre au patient de disposer d'un diagnostic définitif de sa maladie, la découverte de mutations au sein des gènes *ITGA2B* et *ITGB3* a permis d'obtenir un grand nombre d'informations sur la structure et la fonction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. C'est plus particulièrement le cas des mutations faux-sens, pour lesquels un remplacement d'un simple acide aminé peut apporter des informations cruciales sur la fonction d'un résidu, ou sur le domaine protéique auquel il appartient.

La thrombasthénie de Glanzmann est une maladie rare et les premiers cas de mutations génétiques rapportées dans cette maladie l'ont été sur des patients isolés, ou quelques rares familles. Finalement, ce n'est que récemment que les études incluant des séries de patients ont débuté. La première équipe à avoir tenté l'expérience est une équipe italienne qui avait permis d'inclure 30 patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann et d'identifier ainsi 19 nouvelles mutations associées à la maladie [56]. Quatre ans plus tard, en 2006, Peretz et son groupe se lancent dans l'étude de 40 familles provenant du sud de l'Inde et caractérisent ainsi 20 nouvelles mutations associées à la maladie, dont trois

variations génétiques fréquentes, issues d'effets fondateurs [57]. Enfin, ce sont 45 patients non apparentés qui vont être étudiés en 2009 par l'équipe de Kannan permettant ainsi d'identifier 22 nouvelles mutations et d'aboutir à un diagnostic génétique chez 80% des malades [58]. Ces études montrent donc comment l'inclusion de différents groupes de patients a permis d'élargir le spectre mutationnel de cette maladie.

Ces dernières années, les maladies rares sont devenues une priorité de santé publique, ce qui a conduit le gouvernement français à mettre en place un Plan National Maladies Rares, avec pour vocations principales d'améliorer la prise en charge des patients, mais aussi de développer la recherche dans ce domaine. C'est dans ce contexte que le Centre National de Séquençage d'Evry a lancé ses premiers appels à projets visant au génotypage des patients atteints de maladies rares. Nous avons donc répondu à cet appel à projet, pour lequel il nous était proposé de séquencer un total de 90 patients et 6 témoins.

Ce travail comportait une limite essentielle, celle de pouvoir obtenir une série de patients aussi large, dans ce contexte de maladie rare. Initialement, cette étude avait pour but d'inclure des patients d'origine française, mais elle s'est finalement étendue sur le plan international, afin d'inclure les 90 patients requis. L'objectif principal de ce travail était de pouvoir étendre de manière importante le spectre mutationnel de la thrombasthénie de Glanzmann et donc d'accroître la connaissance des éléments essentiels à la structure et la fonction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Pour cela, notre travail a consisté, dans un premier temps, à vérifier si les variations génétiques retrouvées étaient précédemment rapportées comme des polymorphismes ou des mutations associées à la maladie. Dans le cas contraire, nous avons vérifié l'effet pathogène de celles-ci en étudiant : (i) la ségrégation des variations génétiques au sein des familles, lorsque cela était possible, (ii) l'effet *in silico* des variations observées et (iii) pour certaines d'entre-elles, leur effet *in vitro* dans un modèle hétérologue cellulaire.

2.2 CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

Le génotypage des patients a permis d'ouvrir un champ encore mal connu de la médecine, celui de la médecine prédictive. En effet, très rapidement, les médecins se sont attachés à déterminer s'il existait une corrélation entre le génotype des patients et leurs phénotypes, afin éventuellement de prédire le risque évolutif de la maladie et d'en adapter sa surveillance. C'est le cas par exemple du syndrome MYH9, une pathologie plaquettaire constitutionnelle, dans laquelle la chaîne lourde de la myosine non musculaire IIA est anormale. Ce syndrome se caractérise par la survenue d'une thrombopénie à grosses plaquettes, plus ou moins associées à une atteinte rénale, ORL (surdité) ou ophtalmologique (cataracte). Les différentes études portant sur la corélation génotype-phénotype dans cette maladie ont très rapidement pu mettre en évidence qu'il existait un lien entre le domaine dans lequel survenait les mutations et l'atteinte plus ou moins sévère des différents organes, constituant ainsi une information cruciale pour le suivi et la prise en charge de ces patients [59]. Malheureusement, dans la thrombasthénie de Glanzmann, les choses ne se sont pas tout à fait déroulées de la même manière, et les différentes études réalisées n'ont pas permis d'établir une réelle corélation entre le génotype et le phénotype des patients [56-58]. C'est d'ailleurs assez surprenant, car contrairement à la sous-unité α_{IIb} , l'expression de la sous-unité β_3 n'est pas limitée aux plaquettes, puisqu'elle est capable de s'associer à la sous-unité α_v afin de constituer le récepteur de la vitronectine, présent à la surface d'un grand nombre d'autres types cellulaires. En effet, dans une revue récente de la littérature, nous avons étudié les données obtenues chez des modèles de souris délétées en β_3 , où l'absence d' $\alpha_v\beta_3$ influence l'angiogénèse, la reproduction, le métabolisme osseux, l'inflammation, et les atteintes cardio-vasculaires [60], ce qui ne semble pas être le cas chez l'homme. Finalement, c'est le syndrome hémorragique qui prédomine, mais même la sévérité de

celui-ci ne semble pas être associée à un groupe particulier de mutations. C'est un constat qui concerne un grand nombre d'autres maladies hémorragiques car les mécanismes qui conduisent à l'hémostase primaire et à la coagulation sont très complexes et ne dépendent pas que d'un seul gène.

Cependant, il existe un cas bien particulier, celui de l'hémophilie A. En effet, dans cette maladie, les patients sont exposés à une complication gravissime, qui est celle de développer des inhibiteurs (anticorps) dirigés contre le facteur VIII substitutif qu'on leur transfuse [61]. Ces inhibiteurs apparaissent lorsque le système immunitaire du patient attribue ce facteur VIII exogène à une protéine du non-soi. De nombreuses études ont permis d'établir que ce risque était corrélé aux génotypes des malades et que ceux qui étaient porteurs de mutations tronquantes avaient plus de risque de s'immuniser [62]. Il existe dans la thrombasthénie de Glanzmann, une complication similaire. En effet, les transfusions plaquettaires administrées peuvent entraîner le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre la glycoprotéine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [63-66]. La présence de ces anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ représente un problème majeur dans la prise en charge de ces patients [63, 67]. Cependant, à l'heure actuelle, nous ne savons toujours pas quelle est leur fréquence de survenue, leur persistance dans le temps, ou pourquoi ils apparaissent chez certains patients et non chez d'autres.

Des études préliminaires sur la caractérisation de ces anticorps ont montré qu'ils reconnaissent des épitopes localisés sur le complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou sur la sous-unité β_3 et que certains d'entre eux sont capables de bloquer la fonction de l'intégrine, ou bien d'entraîner l'élimination des plaquettes [66, 68, 69]. Ces anticorps dirigés contre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ peuvent donc rendre les transfusions plaquettaires ultérieures inefficaces. Chez les patients immunisés, et réfractaires aux transfusions plaquettaires, il est actuellement recommandé

d'administrer du facteur VII activé recombinant (rFVIIa, NovoSeven®) [70-72], afin de palier à cette complication.

Alors que la survenue d'inhibiteurs est un phénomène bien étudié dans l'hémophilie [61], peu d'études se sont intéressées à ce problème dans la TG. En effet, peu d'éléments sont connus concernant les facteurs de risque associés au développement des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$, bien qu'un lien direct entre leur apparition et le type de TG ait été suggéré [73]. Tandis que le développement de ces anticorps résulte, dans la majorité des cas, du recours à la thérapie transfusionnelle, le degré d'exposition aux concentrés plaquettaires n'a jamais clairement été évalué et la persistance de ces anticorps au cours du temps peu étudié.

Les premières études concernant la survenue d'anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ au cours de la TG ont, dans la majorité des cas, été réalisées sur des cas isolées et concernaient plus particulièrement la caractérisation de ces anticorps [63, 67, 74-76]. Pour la première fois, en 2004, Poon et al. ont étudié la survenue d'anticorps anti-plaquettes chez 54 patients atteints de TG [77]. Seize d'entre eux (30%) présentaient des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$, huit des anticorps anti-HLA (15%) et cinq avaient développé les deux types d'anticorps (9%). Plus récemment, Santoro et al. ont recherché chez 17 patients italiens la présence d'anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ et anti-HLA [78]. Quatre patients (25%) sur les 16 transfusés, présentaient des anticorps anti-plaquettes, dont deux avaient développé des anticorps dirigés contre le système HLA, un des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ et un autre, des anticorps anti-HLA et anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Ces dernières années, par l'intermédiaire du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, nous avons eu l'opportunité de suivre plusieurs patients Glanzmann, dont une majorité était issue de la communauté des Manouches. Grâce aux différentes informations recueillies dans leur passé médical, nous avons réalisé une étude rétrospective afin d'évaluer leur degré d'immunisation et les facteurs de risque qui y étaient associés, en particulier le génotype des patients.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 SÉLECTION DES PATIENTS

Initialement, le génotypage devait concerner des malades d'origine française selon une convention établie entre le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (Dr P. Nurden) et le Centre National de Séquençage (Pr J. Weissenbach). Celle-ci comprenait le séquençage de tous les exons et parties introniques flanquantes des gènes *ITGA2B* et *ITGB3* pour 90 patients et 6 sujets normaux. L'étude a ensuite été ouverte sur un plan international (Argentine, Canada, Maroc, Espagne, Suisse et Etats-Unis) afin d'obtenir la totalité des 90 patients.

Les critères d'inclusion comprenaient : (i) un ou des antécédent(s) hémorragique(s) se caractérisant par la survenue de saignements spontanés (épistaxis, ecchymoses disproportionnées, hématomes, pétéchies, gingivorragies, méno-/métrorragies, hémorragies digestives) ou provoqués de type cutanéomuqueux ; (ii) une absence ou une nette diminution de l'agrégation plaquettaire avec au moins 3 agonistes différents ; (iii) une absence ou une nette diminution de l'expression du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ mesurée par cytométrie en flux ou Western-Blot. Dans les formes variantes où l'expression du complexe peut être proche de la normale, une absence de fixation, après activation plaquettaire, du fibrinogène ou de PAC-1, un anticorps monoclonal reconnaissant le site de fixation du ligand, était requise.

Chaque test phénotypique était réalisé dans les différents centres d'inclusion selon les procédures localement mises en place. L'analyse génétique était réalisée sous réserve de l'obtention du consentement du patient conformément aux lois de bioéthique de chaque

pays. Un questionnaire comprenant les éléments d'informations cliniques et biologiques était à compléter pour chaque patient.

Au total, 76 familles différentes ont été incluses comprenant 83 patients. Sur les 90 patients initialement prévus, deux patients ont été exclus car ils ne remplissaient pas les critères d'inclusion requis, alors que dans cinq autres cas, la qualité de l'ADN des patients n'avait pas permis d'obtenir un séquençage complet des exons.

3.2 SÉQUENÇAGE DE L'ADN

L'ADN a été extrait à partir de sang prélevé sur des tubes EDTA ou à partir de buffy-coat. Les échantillons d'origine étaient adressés, soit à Bordeaux (n=62), soit à Lyon (n=38), où l'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAmp DNA Blood de Qiagen selon les recommandations du fournisseur.

Tous les exons, les régions introniques flanquantes jusqu'à 300 pb, et les régions en amont et en aval des deux gènes ont été séquencés. Ce travail a été réalisé par le Centre National de Séquençage à Evry.

3.2.1 Design des primers

Un total de 10 amplicons ont été designés pour les deux gènes, avec des tailles variant de 1,05 à 5,7 kb. Les primers ont été sélectionnés à l'aide du logiciel Primo [79].

3.2.2 Conditions d'amplification

Les PCR long-fragments ont été réalisés à l'aide de thermocycleurs PTC200 (Biorad) dans un volume final de 50 µL comprenant 50 ng d'ADN génomique, 2,5 U de LA-Taq (Takara) et 2,5 pmol de couple d'amorces.

Les cycles d'amplification comprenaient une étape de dénaturation de 3 sec. à 94°C, une étape d'hybridation de 3 sec., et une étape d'extension à 68°C de 2 min. / kb, répétés pendant 35 cycles.

La qualité des PCR a été contrôlée par la réalisation de gels d'agarose à 1%. Les amplicons ont été purifiés grâce à des billes magnétiques suivant le protocole d'Agencourt AMpure XP (Beckman Coulter).

3.2.3 Réactions de séquence et analyses des résultats de séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide du kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Life Technologies) et comprenaient 30 cycles d'amplification dans un volume de 10 ou 4 µL (96 ou 384 puits, respectivement) et 1,25 pmoles de primers. Les produits de séquençage ont été lus sur un séquenceur 3730 Sequence Analyser (Life Technologies).

Les reads ont été assemblés pour chaque individu par les méthodes PHRED et PHRAP [80, 81]. Les séquences de références étaient les suivantes : NM_000419.3 et NM_000212.2, respectivement pour *ITGA2B* et *ITGB3*.

L'analyse des séquences a été réalisée à l'aide des logiciels SeqMan Pro (DNA Star) ou Mutation Surveyor (SoftGenetics). Chaque variation de séquence identifiée était systématiquement recherchée dans les bases de données suivantes : dbSNP, Glanzmann

thrombasthenia database, Pubmed ou Google afin de vérifier si celle-ci avait déjà été rapportée.

3.3 ANALYSES FAMILIALES

Lorsqu'une nouvelle variation potentiellement pathogène était identifiée, celle-ci était confirmée par séquençage direct et/ou analyse de fusion haute résolution (HRM) sur un nouvel échantillon. D'autre part, lorsque cela était possible, les autres membres de la famille étaient dépistés et étudiés de la même manière afin de vérifier la ségrégation familiale des mutations.

L'HRM est une technique qui a été développée afin de pouvoir dépister rapidement la présence de variations dans un gène [82]. Elle fait appel à un fluorophore hyper-affin pour l'ADN double brin, qui ne gêne pas les différentes étapes d'amplification. Les variations présentes à l'état sauvage, hétérozygote muté ou homozygote muté sont distinguées par leurs profils de fusion obtenus à la fin de l'étape d'amplification par PCR. Les variations présentes à l'état hétérozygote sont généralement les mieux distinguées car leurs températures de fusion sont normalement plus basses.

Brièvement, 20 à 60 ng d'ADN étaient amplifiés à l'aide d'un LightCycler 480 (Roche Diagnostics) dans un volume final de 10 µL avec 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque amorce, et 5 µL du mix de PCR contenant le fluorophore LC green. L'analyse par HRM a été réalisée sur une rampe allant de 70°C à 95°C à la vitesse de 0,02°C / 3 sec. avec 25 acquisitions par degré. Après normalisation, les courbes de fusion étaient comparées à un panel de référence.

Ce travail, que nous avons mis en place pour cette étude, est maintenant réalisé en diagnostic de routine dans le laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux. Il

a d'autre part fait l'objet d'un article que nous avons récemment soumis au journal Plos One.

3.4 ANALYSES *IN SILICO*

Celles-ci ont fait largement appel au logiciel Alamut (Interactive Biosoftware).

3.4.1 Prédiction de l'effet pathogène des mutations faux-sens

Des alignements multiples de séquence des gènes *ITGA2B* et *ITGB3* ont été réalisés afin de déterminer le niveau de conservation de chaque résidu concerné. Les séquences orthologues ont été recherchées grâce au programme BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), puis alignées avec M-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>).

Trois algorithmes différents ont été utilisés pour prédire l'impact sur la protéine du remplacement de l'acide aminé: (i) Align-GVGD (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php/), (ii) Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2 ; genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) et (iii) SIFT (sorting intolerant from tolerant ; <http://sift.jcvi.org/>). Le logiciel Align-GVGD tient compte des caractéristiques biochimiques des acides aminés, ainsi que des alignements multiples de séquences. Polyphen2 permet de déterminer l'impact de la substitution d'un acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine. Le logiciel Polyphen2 indique un score de trois types : « probably damaging », « possibly damaging », ou « benign ». SIFT repose sur le degré de conservation de l'acide aminé grâce à des alignements de séquences réalisés par PSI-BLAST.

3.4.2 Mutations affectant l'épissage

Nous avons fait appel à cinq logiciels de prédiction différents afin de déterminer l'effet possible sur l'épissage de nouvelles variations génotypiques identifiées : (i) Splice Site Finder-like, (ii) MaxEntScan (<http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/>), NNSPLICE (http://www.fruitly.org/seq_tools/splice.html), Gene Splicer (<http://www.cbcb.umd.edu/genesplicer/>) et Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>).

3.5 RECHERCHE DE GRANDS RÉARRANGEMENTS GÉNOMIQUES

Ce travail a été réalisé par l'équipe du Pr Vinciguerra à Lyon. La recherche des grands réarrangements a concerné deux groupes de patients : (i) ceux pour lesquels aucune anomalie génétique n'avait été mise en évidence et (ii) ceux présentant une seule mutation à l'état hétérozygote. Tous les exons des deux gènes ont été amplifiés sous la forme de simples amplicons. Les primers ont été designés en utilisant le logiciel primer-blast en accès libre, afin d'amplifier des amplicons de 200 pb environ.

3.5.1 Conditions d'amplification

Les PCR en temps réel ont été réalisées sur un appareil Rotor-Gene 6000 (Qiagen) dans un volume de 20 μ L à l'aide du kit QuantiTect SYBR Green (Qiagen), avec 5 ng d'ADN génomique et 15 pmoles de chaque amorce. La première étape de dénaturation durait 15' à 95°C, puis 40 cycles étaient réalisés, comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 sec., une étape d'hybridation à 60°C pendant 15 sec., et une étape

d'élongation à 72°C pendant 20 sec. Chaque patient était passé en triplicate dans chaque run.

3.5.2 Analyses des résultats

L'expression relative de chaque gène a été comparée à celle d'un gène de référence (HMBS : hydroxymethylbilane synthase). Une méthode à 2 courbes standards (Rotor-Gene Q series) a été utilisée. Le ratio est de 1 lorsqu'il n'y a pas de réarrangement, 0,5 pour une délétion hétérozygote, 1,5 pour une duplication hétérozygote, et 2 pour une duplication homozygote.

3.6 ÉTUDES PAR MINIGÈNE

La construction des minigènes comprenait un fragment génomique comportant l'exon d'intérêt portant la mutation, ainsi que l'exon en amont et celui en aval. Le fragment génomique a été synthétisé par Epoch Life Science et cloné dans un plasmide Exontrap (MoBiTec GmbH). Les cellules Cos-7 ont été cultivées à une concentration de 8.10^4 cellules par puits dans des plaques de 12 puits avec 1 mL de DMEM (Invitrogen) supplémenté en sérum de veau fœtal 10%, de pénicilline/streptomycine et 1M d'HEPES (Lonza) à 37°C dans 5% de CO₂. Vingt-quatre heures plus tard, les minigènes sauvages ou mutés ont été transfectés transitoirement dans les cellules à l'aide du réactif jetPRIME (Polyplus-transfection SAS) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont alors été incubées 48 h avant extraction de l'ARN au trizol (Molecular Research Center). L'ADNc a été synthétisé avec le kit M-MLV reverse transcriptase (Promega) en utilisant 2 µg d'ARN et amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits amplifiés ont

été séparés sur gel d'agarose 2%, puis séquencés sur un appareil CEQ8000 (Beckmann Coulter). Les PCR en temps réels ont été effectués sur un LightCycler 96 (Roche Diagnostics).

3.7 MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE ET EXPRESSION DANS UN MODÈLE CELLULAIRE HÉTÉROLOGUE

Les cDNA des sous-unités α_{IIb} et β_3 clonés dans des vecteurs pcDNA3 nous ont été généreusement fournis par le Dr N. Rosenberg (Thrombosis and Hemostasis Institute, Sheba Medical Center, Israël). Les mutations d'intérêts ont été introduites dans les vecteurs concernés à l'aide du kit QuickChange II XL (Agilent Technologies) selon les recommandations du fournisseur et les cellules Cos-7 ont été cultivées de la même manière que précédemment (chapitre 3.4).

3.7.1 Mesure par cytométrie en flux

Quarante-huit heures après transfection des cellules, celles-ci sont décollées et passées dans un cytomètre Accuri C6 (Becton Dickinson) où l'expression du complexe a été mesurée à l'aide des anticorps monoclonaux (marquage FITC) suivants : anti-CD41/P2, anti-CD41/SZ22 (Beckman Coulter) et anti-CD61 (Dako). L'état d'activation du complexe a été évalué à l'aide de l'anticorps monoclonal PAC-1 (BD Biosciences) après incubation des cellules avec 1 mM de $MnCl_2$.

3.7.2 Western-Blotting

Les cellules transfectées et cultivées sont secondairement lysées en présence d'un tampon contenant du SDS. L'électrophorèse sur gel de polyacrilamide est effectuée sur un gel gradient à 10%, en présence ou non de 1 mM de dithiothreitol (DTT), puis le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose. Les sous-unités α_{IIb} et β_3 ont été révélées à l'aide des anticorps monoclonaux suivants : SZ22 (α_{IIb} , Beckman Coulter) et Y2/51 (β_3 , Dako), par chimiluminescence avec un anticorps secondaire marqué à la peroxydase.

3.8 MODÉLISATION PROTÉIQUE STATIQUE

Les modèles protéiques ont été élaborés à l'aide du logiciel PyMol version 1.3. et des fichiers pdb suivants: (i) 3 fcs ou 2 vdo pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, respectivement dans sa conformation repliée ou étendue ; (ii) 2knc correspondant aux domaines transmembranaire et intra-cytoplasmique. Les acides aminés ont été visualisés sous la forme de rotamère montrant les changements de conformation inclus à partir de la librairie Dunbrack Backbone avec la plus forte probabilité.

3.9 MODÉLISATION PROTÉIQUE DYNAMIQUE

Celles-ci ont été réalisées comme précédemment décrit par Laguerre et al [83]. Brièvement, nous avons utilisé le fichier pdb 3FCS (résolution 2,25 Å) tronqué au niveau des domaines membranaires proximaux. Le complexe protéique a été placé dans une boîte d'eau rectangulaire de dimension : 110 x 100 x 100 Å. Le système a alors été neutralisé et 150 mM de NaCl ajoutés, produisant au final une boîte contenant 29100 à 29200 molécules

d'eau et environ 184 molécules de NaCl. Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel GROMACS 4.5 et GROMOS96. Le modèle utilisé pour l'eau était SPC ("Simple Point Charge") et les simulations dynamiques ont été réalisées à température constante.

La sous-unité α_{IIIb} présentant la mutation Gly44Val a été créée à l'aide du module approprié du logiciel "Discovery Studio v. 3.1". Les analyses de trajectoire RMSD (root mean square deviations) ont été calculées sur les positions Ca.

4 RÉSULTATS

4.1 PHÉNOTYPE DES PATIENTS

Les phénotypes présentés par les 83 patients inclus dans cette étude sont résumés dans le tableau II de la thèse. Parmi les 76 familles de patients, 58 (76%) présentaient une TG de type I, dix (12%) présentaient un profil de type II et sept autres (10%) étaient atteints d'une forme variante de la maladie; une famille n'ayant pas pu être caractérisée (données insuffisantes).

Les patients décrivaient un panel de signes hémorragiques relativement large, comprenant : des épistaxis, des ecchymoses, des hématomes, des pétéchies, des gingivorragies, des ménorragies ou des hémorragies digestives. Les hémarthroses spontanées étaient exceptionnelles. La majorité des patients avaient reçu une ou plusieurs transfusions de plaquettes, de concentrés de globules rouges ou de facteur VII activé recombinant.

4.2. GÉNOTYPE DES PATIENTS

Le tableau III présente les variations génétiques potentiellement pathogènes retrouvées chez les 83 patients inclus. Lorsque cela était possible, ces variations ont été confirmées sur un nouvel échantillon. La distribution des mutations retrouvées sur les deux gènes est représentée sur la figure 10 et leur répartition par types sur la figure 11.

Tableau II. Données clinico-biologiques des patients inclus dans l'étude.

Patient	Gender	Age (y)	Origin ¹	Platelet aggregation	α IIb β 3 expression ²	WB ³ /clot retraction	Genotyping			Bleeding symptoms	Treatment	Anti- α IIb β 3 antibodies	Other comments
							Consang. unity	Other affected familial cases	data other family members				
GT1	M	9	Fr/Afr	Absent	<5%	NA/NA	Yes	No	Yes	Significant bruising, persistent bleeding after surgery, major episodes of epistaxis, gingivorrhagia, tonsillar haemorrhage	Platelets, RBC, rFVIIa, anti-fibrinolytic	NA	None
GT2	F	58	Fr/Alg	Small amount (ADP, collagen); significant TRAP	Normal	Normally migrating α IIb and β 3/normal	Yes	2 brothers, 1 sister	No (ITB3 and ITGA2)	Mucocutaneous bleeding from 18 months (epistaxis, hematomas, bleeding after tooth extraction). Severe menorrhagia	Platelets. Hormone therapy.	NA	Homozygous CALDAG-GEFI mutation (Canault et al, In Press)
GT3	F	32	Fr	Absent	<5%	NA/NA	NA	No	No	Epistaxis, ecchymoses, purpura since birth. Sometimes severe with hospitalisation. GI bleeding. Excessive menstrual bleeding	Multiple transfusions (RBC, platelets). Birth control pills	Yes	None
GT4	M	6	Fr (Gypsy)	Absent	50%, no binding of PAC-1 after activation	Normally migrating residual α IIb and β 3/normal	Yes	No	No	Petechia and hematomas since childbirth, severe bleeding. Fever and infections since childbirth	Platelets, RBC	No	Moderate immunodeficiency. Homozygous kindlin-3 mutation (Robert et al 2011)
GT5	M	7	Fr	Absent	NA (<5% brother)	NA/NA	No	1 brother	Yes	Epistaxis, easy bruising, post-traumatic bleeding. Subarachnoid hemorrhage	rFVIIa, anti-fibrinolytic	NA	None
GT6	F	19	Fr/Alg	Absent	<5%	NA/NA	Yes	No	Yes	Easy bruising, gingivorrhagia. Severe bleeding syndrome	RBC, platelets, rFVIIa, tranexamic acid	Yes	None
GT7	F	18	Fr	Absent ADP but some response with other agonists	10-15%	Residual α IIb and β 3/NA	No	1 brother	Yes	Easy bruising and epistaxis	Anti-fibrinolytic	NA	None
GT8	M	82	Fr	Absent	10-15%	Residual α IIb and β 3/partial	Yes	No	No	Easy bruising, epistaxis, severe GI bleeding in later life	Platelets, RBC, rFVIIa, somatostatin	No	Died of lung cancer with brain metastasis
GT9	M	86	Fr	Absent	10-20%	Residual α IIb and β 3/partial	No	No	Yes	Moderate mucocutaneous bleeding especially epistaxis	RBC, platelets for hip arthroplasty	No	Poor survival of transfused platelets
GT10	M	45	Fr/Ita	Residual	30-50%	Residual α IIb, β 3/NA	No	No	Yes	Mild lifelong bleeding	None	No	None

Table II. Suite.

GT11	F	54	Fr/Ge	Absent	10-15%	Residual α IIb, β 3/NA	No	No	Yes	Severe epistaxis, gingival bleeding, menorrhagia, and spontaneous bruising	NA	NA	Skeletal defects
GT12	F	61	Fr	Absent	<5%	No α IIb, residual β 3/absent	Yes	Brother (died at birth)	No	Easy bruising, epistaxis, hematuria, heavy bleeding at menarche	RBC, platelets, rFVIIa(2)	Yes	Type 2 diabetes, Factor V Leiden
GT13	F	14	Fr	Absent	<5%	NA/NA	No	No	No	Petechiae, moderate bleeding syndrome	NA	Yes	
GT14	F	10	Fr	Absent	<5%	Traces α IIb, β 3/NA	No	No	Yes	Purpura, moderate cutaneous bleeding from birth, prolonged bleeding after tooth removal	Anti-fibrinolytic	No	None
GT15	F	35	Fr	Absent	<5%	Absence of α IIb (CBP) and platelet Fg	No	No	No	Bleeding from birth. Ecchymoses, petechia. Severe epistaxis. Bleeding from teeth. Hematomas from exercise (ballet). Gingivorrhagia.	RBC, platelets (5). Anti-fibrinolytic. Dental paste	Yes	None
GT16	F	58	Fr	Absent	Qualitative defect/No PAC-1 or Fg binding	α IIb, β 3 slightly diminished	No	No	No	Very severe in later life. Gingivorrhagia, frequent and severe epistaxis. Extensive GI bleeding.	Multiple transfusions. RBC, platelets, rFVIIa, somatostatin	No	Died from brain hemorrhage
GT17	F	20	Fr	Absent except for TRAP	Normal	Normal/Absent	Yes	No	No	Easy bruising, severe epistaxis, severe bleeding at menarche requiring hospitalization	Multiple platelet transfusions	No	Now has ITP
GT18	M	20	Fr	Residual (high dose ADP, coll)	10%	NA/NA	No	No	No	Mild: ecchymoses, easy bruising	Platelets (1) before surgery	No	None
GT19	F	44	Fr (Gypsy)	Absent	<5%	NA/NA	Yes	Brother, cousin	No	Menorrhagia, epistaxis, easy bruising and gingivorrhagia	rFVIIa	Yes	None
GT20	M	28	Fr	Absent	10-20%	NA/NA	No	No	No	Epistaxis, occasional hematomas, hemarthrosis (knee)	Platelets (2X prior to surgery), anti-fibrinolytic	No	None
GT21	F	61	Fr	Absent	<5%	β 3 only (strong band)/ NA	No	No	No	Epistaxis, GI bleeding	Platelets, RBC, somatostatin	No	None
GT22	M	13	Fr	Absent	<5%	NA/NA	No	NA	Yes	Easy bruising, gingivorrhagia	Platelets after trauma, anti-fibrinolytic	No	None
GT23	M	19	Fr	Absent	<5%	NA/NA	No	No	Yes	Severe epistaxis, easy bruising, gingivorrhagia	RBC, platelets, anti-fibrinolytic	No	None
GT24	F	45	Fr (gypsy)	Absent	<5%	NA/NA	Yes	NA	No	Post-traumatic hematomas and epistaxis, menorrhagia (linked to a uterine fibroma)	NA	No	None

Table II. Suite.

GT25	M	81	Fr	Absent	<5%	No α IIb and trace of β 3/absent	No	No	No	Lifelong bleeding disorder - severe when young, GI bleedings in later life	Multiple transfusions: RBC, platelets, rFVIIa - arterial thrombosis (myocardial and cerebral- possibly linked to use of rFVIIa)	Yes	Recently deceased. Strong inhibitory antibody (IgG1....)
GT26	M	45	Fr	Much reduced	<5%	NA/NA	Yes	No	Yes	Severe epistaxis, easy bruising	RBC	No	Hirschprung's disease
GT27	F	84	Fr	Absent	5-10%	Residual α IIb and β 3/NA	No	No	No	Relatively moderate when young (echymose, bleeding after trauma); later severe GI bleedings	RBC, platelets	No	Recently deceased
GT28	M	36	Fr/Syr	Absent	<5%	NA/NA	Yes	Sister	No	NA	NA	NA	None
GT29	M	52	USA	Absent	Normal/Qualitative defect	Normal α IIb and β 3/partial	No	Sister	No	Limited information. Severe bleeding after surgery.	RBC, platelets, rFVIIa	No	Surgery: successful removal of brain tumour
GT30	F	NA	USA	Absent	<5%	α IIb and β 3 absent/NA	No	Brother	No	Epistaxis, GI bleeding, diffuse bruising mainly with trauma	RBC, platelets, anti-fibrinolytic	No	None
GT31	F	13	USA	Absent	<5%	Trace β 3 only	No	No	No	Life-threatening bleeding at onset of menses and in later life. Rare gum bleeding and epistaxis	Platelets, RBC, rFVIIa, hormonal therapy, anti-fibrinolytic, ablation, hysterectomy	No	None
GT32	M	NA	USA	Absent	<5%	α IIb and β 3 absent/NA	NA	No	No	Severe bleeding when young, epistaxis	Anti-fibrinolytic, RBC	NA	Successful bone marrow transplant
GT33a	M	NA	USA/Laos	Absent	<5%	α IIb and β 3 absent/NA	NA	Sister (33b)	Yes	Severe from birth, epistaxis, GI bleeding	Platelets, RBC, anti-fibrinolytic	No	Died in car accident
GT33b	F	NA	USA/Laos	Absent	<5%	α IIb and β 3 absent/NA	NA	Brother (33a)	Yes	Severe from birth, epistaxis, GI bleeding	Platelets, RBC, anti-fibrinolytic	No	Died in car accident
GT34	M	15	USA	Absent	<5%	β 3 residual/NA	NA	No	No	Severe life-threatening bleeding especially epistaxis, GI bleeding	Platelets, RBC, anti-fibrinolytic	No	None
GT35a	F	18	USA	Absent	<5%	α IIb and β 3 absent/NA	No	Sister (35b)	Yes	Severe life-threatening bleeding especially epistaxis. Severe GI bleeding	Platelets, RBC, FVIIa. Many hospital visits in early life	Yes	Successful bone marrow transplant
GT35b	F	16	USA	Absent	<5%	α IIb and β 3 absent/NA	No	Sister (35a)	Yes	Severe life-threatening bleeding especially epistaxis. Severe GI bleeding	Platelets, RBC, FVIIa. Many hospital visits	Yes	Successful bone marrow transplant
GT36a	F	49	Sp	Absent	<5%	No α IIb but residual β 3/ Absent	No	Brother (36b) and sister (36c)	Yes	Mild phenotype with epistaxis, gingivorrhagia. Bleeding at onset of menses	RBC (2X)	NA	None

Table II. Suite.

GT36b	M	60	Sp	Absent	<5%	No a1b but residual $\beta 3$ /Absent	Sisters (36a and 36c)	Yes	Mild when child but severe repeated epistaxis when adult. Embolization of the submaxillary artery.	RBC, platelets (many times when adult)	NA	None
GT36c	F	47	Sp	Absent	<5%	No a1b but residual $\beta 3$ /Absent	Brother (36b) and sister (36a)	Yes	Little spontaneous bleeding as a child but extensive bleeding after trauma. Menorrhagia, severe postpartum hemorrhage, intra-abdominal bleeding	RBC, platelets (many times, 6 months in hospital for postpartum bleeding)	NA	None
GT37	M	58	Sp	Absent	<5%	Slight trace of $\beta 3$ /Much reduced	No	No	Extensive bleeding syndrome	Platelets (several occasions)	Yes	Strong inhibitory Ab (see Jallu et al 1994)
GT38	F	9	Sw/USA	Absent	<5%	NA/NA	No	Yes	Lifelong petechiae, easy bruising, GI bleedings.	rFVIIa (GI bleeding), anti-fibrinolytic	NA	None
GT39a	M	NA	Sw	Absent	<5%	Residual $\beta 3$ /NA	Yes	Brother (39b)	Significant bleeding syndrome	NA	NA	None
GT39b	M	NA	Sw	Absent	<5%	Residual $\beta 3$ /NA	Yes	Brother (39a)	Significant bleeding syndrome	NA	NA	None
GT40	F	17	Ca/Pak	Absent	<5%	NA/NA	Yes	NA	Epistaxis, mouth bleeds, easy bruising. Heavy bleeding at menarche.	rFVIIa (1), anti-fibrinolytic	NA	None
GT41a	F	15	Ca/Ch	Absent	about 5%	NA/NA	No	Brother (41b)	Frequent and severe epistaxis often requiring hospital treatment, easy bruising	Platelets (3), rFVIIa, nasal support, anti-fibrinolytic	NA	None
GT41b	M	13	Ca/Ch	Absent	about 5%	NA/NA	No	Sister (41a)	Epistaxis, ecchymoses, easy bruising (less severe than sister)	rFVIIa (once), anti-fibrinolytic	NA	None
GT42	M	15	Ca/Egy	Absent	<5%	NA/NA	Yes	Two elder siblings	Cephalohematoma at birth, GI bleedings, ecchymoses, circumcision with platelet transfusion but still bleeding	Platelets and RBC - several times. Anti-fibrinolytic	NA	None
GT43a	F	7	Mor	NA	<5%	NA/NA	Yes	Brother (43b)	Severe epistaxis	RBC	NA	Died from severe epistaxis
GT43b	M	11	Mor	NA	<5%	NA/NA	Yes	Sister (43a)	Moderate, epistaxis, purpura, ecchymoses, petechia. Much bleeding at circumcision	RBC	NA	None
GT44	F	10	Fr	Absent	<5%	Absence of a1b and $\beta 3$ /NA	No	No	NA	RBC, platelets	Yes	None

Table II. Suite.

GT45	M	86	Fr	Absent	<5%	Trace β_3 /NA	No	NA	No	Severe epistaxis, gingivorrhagia, GI bleeding (ulcer)	RBC, platelets (many times), Platelets, RBC and rFVIIa before surgery	NA	None
GT46	F	83	Sp	Absent (residual response to thrombin)	Normal, qualitative defect	Normal/Absent	No	No	No	Occasional epistaxis, gingivorrhagia, menorrhagia. Bleeding after surgery	No treatment. Pregnancy and childbirth without bleeding.	No	None
GT47	M	11	Fr	Absent	<5%	NA/Absent	Yes	No	Yes	Severe mucocutaneous bleeding (few details)	RBC, platelets, rFVIIa	Yes	None
GT48	M	10	Fr	NA	<5%	NA/NA	No	No	Yes	Echymoses, frequent hematomas, rare epistaxis. No serious episode of spontaneous bleeding. Trauma-related bleeding. Diagnosed at 66 years of age	Platelets, RBC, anti-fibrinolytic	No	None
GT49	F	16	Fr/Sp	Absent	5-10%	NA/NA	No	No	No	Severe epistaxis, ecchymoses, post-traumatic hematomas	No treatment	NA	None
GT50	M	78	Fr	Absent	<5%	Absence of α IIb and β_3 /NA	Yes	NA	No	Moderate bleeding syndrome, ecchymoses, gingivorrhagia	RBC, platelets	No	None
GT51	M	29	Fr/Afr	Absent	NA	Absence of α IIb and β_3 /Absent	No	No	No	Epistaxis and mucocutaneous bleeding	Platelets, rFVIIa	No	None
GT52	M	24	Arg/Br	Absent	<5%	Residual α IIb and pro- α IIb/decreased	No	No	No	Epistaxis and hematomas, decreased during adolescence	Platelets, RBC, tranexamic acid	NA	None
GT53	M	16	Arg/Br	Absent	<5%	NA/decreased	No	No	No	Epistaxis, hematomas	Tranexamic acid	NA	None
GT54	M	33	Arg/Ita	Absent	<5%	No α IIb, very weak β_3 /Absent	No	No	No	Diagnosed when 19; hematomas, gingivorrhagia, bleeding after tooth extraction	Platelets, RBC tranexamic acid	NA	None
GT55	F	28	Arg/Br	Absent	11-22%	Residual α IIb, pro- α IIb and β_3 /decreased	No	Sister	No	Epistaxis, gingivorrhagia	Platelets, RBC, rFVIIa, tranexamic acid, nasal tamponade	NA	Sister died from bleeding when 3
GT56	M	11	Arg/Ita	Absent	<5%	NA/decreased	No	Sister and brother	No	Epistaxis, hematomas, gingivorrhagia	Platelets, RBC, rFVIIa, tranexamic acid, nasal tamponade	NA	None

Table II. Suite.

GT57	F	10	Arg/Eur	Absent	<5%	NA/Decreased	No	No	No	Hematomas, petechia, epistaxis	Platelets, tranexamic acid, nasal tamponade	NA	None
GT58	M	14	Arg/Eur	Absent	<5%	NA/Decreased	No	No	No	Epistaxis, gingivorrhagia, petechia, hyphema	Platelets, rFVIIa before eye surgery, tranexamic acid	NA	None
GT59	M	7	Arg/Peru	Absent	<5%	NA/Decreased	No	No	No	Hematoma, petechia, epistaxis	Tranexamic acid	NA	Deafness; sister with Waardenburg syndrome
GT60	M	54	Fr/Ita	Absent	<5%	Absence of α IIb and β 3, -	Probable	No	No	Epistaxis, easy bruising, gingivorrhagia, GI bleeding (adult)	Platelets, RBC (after tooth extraction and other surgery)	No	None
GT61	F	49	Fr/Ita	Absent	<5%	NA	No	Brother (deceased)	No	Easy bruising, tonsil bleeding. Menorrhagia.	RBC, platelets for menstrual bleeding. Tooth extractions after platelet transfusion	Yes	Transient ischemic attack (2010)
GT62	F	58	Fr	Absent	<5%	NA	No	Sister	No	Oesophageal bleeding, easy bruising, gingivorrhagia, menorrhagia. Bleeding after tooth extraction. Bleeding less frequent in later life.	RBC, platelets, rFVIIa (before surgery). Anti-fibrinolytic.	No	Chronic lymphocytopenia (since 2007)
GT63	M	18	Fr/Alg	Absent	<5%	NA	No	No	No	Born with purpura. Ecchymoses, hematoma. Epistaxis, gingivorrhagia. Hemarthroses post-traumatic (sport). Heavy menstrual bleeding.	None	No	None
GT64	F	26	Fr	Absent	<5%	NA	No	No	No	Epistaxis, Mouth and tonsil bleeding. Easy bruising, menorrhagia. Adult: mostly gingovorrhagia, ecchymose	RBC, platelets	No	None
GT65	F	31	Fr	Absent	<5%	NA	No	No	Yes	Epistaxis, gingivorrhagia, tonsillar bleeding, menorrhagia, hematuria, GI bleeding. Bleeding after tooth extraction, muscle hematomas	Many transfusion: RBC, platelets (also prior to childbirth), nasal packs	No	None
GT66	F	15	Fr/Ko	Absent	<5%	NA	Yes	Yes (cousins)	No	Bleeding from birth. Cleft palate surgery(at 3mo). Regular gingival bleeding, epistaxis, ecchymoses and haematomas	RBC, platelets (history of refractoriness), rFVIIa (tooth extraction). Tranexamic acid	No	None
GT67	M	61	Fr	Absent	<5%	NA/no	Yes	Brother (dead)	No	Mild, gingival bleeding at 6 mo, epistaxis. Bleeding after tooth extraction and surgery. Trauma -related (car accident)	RBC, platelets, rFVIIa	Yes	None

Table II. Suite.

GT68	M	62	Fr	Absent	<5%	NA	NA	NA	No	Occasional spontaneous bleeding - frequency decreased with age.	Platelets after immunoadsorption, RBC and rFVIIa prior to invasive procedures (hemicolectomy for adenocarcinoma, polypectomy), tranexamic acid	Yes	None
GT69	F	32	Fr	Absent	<5%	NA	Yes	No	No	Bruising, purpura, severe recurrent epistaxis, menorrhagia, Post-operative bleeding (knee arthroplasty), Dental extraction without bleeding.	RBC (19), platelets (12), rFVIIa (+ platelets for nose and ear repair), hormonal therapy, tranexamic acid.	Yes	None
GT70	F	21	Fr/Arab	Absent	<5%	NA	Yes	No	No	Bleeding since birth, bruising, purpura, hematomas, GI bleeding, oropharynx bleeding, epistaxis, menorrhagia.	RBC, platelets, tranexamic acid, hormonal therapy	Yes	None
GT71	F	40	Fr	Absent	<5%	NA	Yes	No	No	Marked spontaneous bleeding. Epistaxis (frequent), gingivorrhagias, GI bleeding, Menorrhagia. Spontaneous ecchymoses and after mild trauma.	Multiple transfusions :RBC, platelets, rFVIIa prior to surgery, Hormonal therapy.	Yes	None
GT72	F	56	Fr	Absent	<5%	Absence of alib and traces of β_3 , absent	NA	No	No	Marked bleeding syndrome with epistaxis, ecchymoses, gingivorrhagia, menorrhagia. Bleeding after tooth extraction, GI bleeding due to a rectal polyp treated by photocoagulation.	Many hospitalisations when young. RBC, platelets, oral contraceptives	No	None
GT73	F	34	Fr	Absent	Normal or reduced (according to antibody)	NA	NA	No	No	Post-traumatic ecchymoses, Epistaxis- severe during childhood. Gingivorrhagias, Menorrhagia.	RBC, platelets, rFVIIa. Hormonal therapy antibody?)	Yes (allo-	None
GT74	F	14	Fr	Absent	<5% (sister)	NA	No	Yes	Yes	Important during childhood. Serious mouth bleeding with several hospital stays. Post-traumatic heavy bruising, GI bleeding and melena. Heavy bleeding after adenoid removal.	Platelets (multiple occasions), RBC	NA	None
GT75	F	9	Fr/Afr	Absent	<5%	NA	No	No	No	Ecchymoses, severe epistaxis (4 hospital stays - with treatment). Rare gingivorrhagias. Loss of deciduous teeth with bleeding. Hematomas in eye and under clavicle	RBC, platelets (many times)	NA	None
GT76	M	54	Fr/NA	Absent	NA	NA	NA	NA	NA	GI bleeding. Otherwise moderate bleeding syndrome. Hemorrhoids, Three surgical interventions under rFVIIa	RBC, platelets, rFVIIa (3)	Yes	None

¹ Country of residence/of origin if different. Fr: France; Ita: Italia; Ch: China; Ge: Germany; Mor: Morocco; Alg: Algeria; Pak: Pakistan; US: United States; Sp: Spain; Sw: Switzerland; Ca: Canada; Ko: Korea; Afr: Africa; Eur: European.

² Measured by flow cytometry

³ Western-Blot analysis

Other abbreviations: RBC: red blood cell concentrates; NA: data not available; TRAP: thrombin receptor activating peptide

Des mutations des sites d'épissage, des micro-insertion/délétion, des mutations faux-sens et des mutations non-sens ont été identifiées. Sur les 78 variations génétiques différentes retrouvées, 57 étaient nouvelles. La ségrégation familiale des mutations a été vérifiée par "High Resolution Melting curve analysis" et/ou par séquençage direct. Un exemple de résultat d'HRM est représenté sur la figure 12.

Les mutations ont été retrouvées à l'état homozygote chez 28 familles (37%); dans un contexte de consanguinité, dans la majorité des cas (63%). Pour une famille d'origine marocaine (GT43a et GT43b), nous avons identifié dans *ITGB3* la présence de deux mutations différentes à l'état homozygote (une mutation du site d'épissage c.614+1G>T et une mutation faux-sens R228H). L'analyse par HRM a confirmé que chaque parent était porteur de ces deux mutations à l'état hétérozygote. Cette famille provenait d'une région isolée du Maroc où la consanguinité sur plusieurs générations était fortement probable.

Pour 32 familles (42%), les mutations ont été retrouvées à l'état hétérozygote composite. Parmi elles, les patients GT3 et GT35 étaient porteurs de trois mutations potentiellement délétères, réparties sur les 2 gènes pour GT35.

Pour cinq patients, l'analyse génotypique n'a pu identifier qu'une seule mutation présente à l'état hétérozygote. Parmi eux, deux patients présentaient une maladie de type I (GT45 et GT47), un patient présentait une TG de type II (GT20) et deux patients présentaient une forme variante de la maladie (GT4 et GT73).

Enfin, aucune mutation n'a été identifiée pour 11 familles, incluant six patients de type I (GT32, GT37, GT56, GT59, GT63 et GT71) et cinq patients atteints de forme variante (GT2, GT16, GT17, GT29 and GT46).

Tableau III. Mutations identifiées chez les 83 patients (en rouge, mutations déjà rapportées).

GT	ITGA2B		ITGB3	
	Mutation1	Mutation2	Mutation1	Mutation2
1	-	-	E11/c.1913+1G>A/splice	E11/c.1913+1G>A/splice
2	-	-	-	-
3	-	-	E3/c.353T>A/Leu118His	E5/c.708_709del/Ser237CysfsX13 E11/c.1732G>A/Asp578Asn
4	I15/c.1544+1G>A/splice*	-	-	-
5	-	-	E4/c.565C>T/Pro189Ser*	E13/c.2113Cdel/Leu705CysfsX4*
6	-	-	E7/c.940G>T/Asp314Tyr	E7/c.940G>T/Asp314Tyr
7	-	-	E3/c.187C>T/Arg63Cys	E4/c.505C>T/Arg169X
8	I23/2348+5G>C/splice	I23/2348+5G>C/splice	-	-
9	-	-	E5/c.665T>C/Leu222Pro	E11/c.1871G>A/Cys624Tyr
10	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	E30/c.3077G>A/Arg1026Gln	-	-
11	E12/c.1073G>A/Arg358His*	E13/c.1234G>A/Gly412Arg	-	-
12	-	-	E4/c.565C>T/Pro189Ser*	E4/c.565C>T/Pro189Ser*
13	E7/c.682C>T/p.Gln228X	E17/c.1750C>T/p.Arg584X	-	-
14	E4/c.423G>T/Trp141Cys	E28/c.2902del/Tyr968MetfsX163	-	-
15	I20/c.2095-19T>A/splice	E27/c.2770C>T/Gln924X	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	E12/c.1201G>T/Gly401Cys	E27/c.2800G>T/Val934Phe*	-	-
19	I15/c.1544+1G>A/splice*	I15/c.1544+1G>A/splice*	-	-
20	E27/c.2800G>T/Val934Phe*	-	-	-
21	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	E28/c.2864T>A/Leu955Gln	-	-
22	I3/c.408+11C>A/splice	E13/c.1259T>C/p.Val420Ala	-	-
23	-	-	E7/c.1031A>C/Tyr344Ser	E7/c.1031A>C/Tyr344Ser
24	I15/c.1544+1G>A/splice*	I15/c.1544+1G>A/splice*	-	-
25	E14/c.1413C>G/Tyr471X*	E19/c.1882C>T/Arg628X*	-	-
26	E12/c.1073G>A/Arg358His*	E12/c.1073G>A/Arg358His*	-	-
27	E14/c.1413C>G/Tyr471X*	E25/c.2468G>A/Gly823Glu	-	-
28	Dup Exon 3-12	Dup Exon 3-12	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	E5/c.777+1G>A/splice*	E5/c.777+1G>A/splice*
31	E18/c.1771dup/Asp591GlyfsX47	I29/c.3061-1G>A/splice	-	-
32	-	-	-	-
33a	-	-	E3/c.262C>T/Arg88X	E13/c.2113Cdel/Leu705CysfsX4*
33b	-	-	E3/c.262C>T/Arg88X	E13/c.2113Cdel/Leu705CysfsX4*
34	E16/c.1553T>A/Ile518Asn	I19/c.1946+3G>T/splice*	-	-
35a	E22/c.2264G>A/Arg755Gln	-	E4/c.392G>C/Arg131Pro	E5/c.777+1G>A/splice*
35b	E22/c.2264G>A/Arg755Gln	-	E4/c.392G>C/Arg131Pro	E5/c.777+1G>A/splice*
36a	E1/c.131G>T/Gly44Val	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	-	-
36b	E1/c.131G>T/Gly44Val	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	-	-
36c	E1/c.131G>T/Gly44Val	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	E1/c.79+1G>A/splice	E7/c.940-2A>G/splice
39a	E19/c.1882C>T/Arg628X*	E19/c.1882C>T/Arg628X*	-	-
39b	E19/c.1882C>T/Arg628X*	E19/c.1882C>T/Arg628X*	-	-
40	E9/c.857T>A/Val286Asp	E9/c.857T>A/Val286Asp	-	-
41a	E1/c.91del/Ala311ProfsX2	E28/c.2915dup/Leu973AlafsX63	-	-
41b	E1/c.91del/Ala311ProfsX2	E28/c.2915dup/Leu973AlafsX63	-	-
42	E21/c.2148dup/Leu717AlafsX3	E21/c.2148dup/Leu717AlafsX3	-	-
43a	-	-	E4/c.614+1G>T/splice	E4/c.614+1G>T/splice
43b	-	-	E5/c.683G>A/Arg228His	E5/c.683G>A/Arg228His
44	E13/c.1357C>T/Arg453X	E13/c.1357C>T/Arg453X	-	-
45	E4/c.550_625-35del/splice	-	-	-
46	-	-	-	-
47	E8/c.832del/Asp278IlefsX101	-	-	-
48	-	-	E8/c.1094A>G/Asn365Ser	E10/c.1522del/Gln508SerfsX161
49	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	E21/c.2113T>C/Cys705Arg	-	-
50	-	-	E9/c.1260G>A/splice	E9/c.1260G>A/splice
51	-	-	E6/c.861del/Arg287SerfsX34	E10/c.1456del/p.486AlafsX183
52	E5/c.601G>A/Gly201Ser*	E5/c.601G>A/Gly201Ser*	-	-
53	-	-	E3/c.356G>A/Arg119Gln	E11/c.1697G>A/Gly566Asp
54	-	-	E12/c.2014+5G>A/splice	Del E14-E15
55	E6/c.647C>T/Ala216Val	E6/c.647C>T/Ala216Val	-	-
56	-	-	-	-
57	E4/c.571T>G/splice (Phe191Val)	E11/c.961G>T/p.Gly321Trp	-	-
58	E5/c.601G>A/Gly201Ser*	E5/c.601G>A/Gly201Ser*	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	E11/c.1801T>C/p.Cys601Arg	E11/c.1801T>C/p.Cys601Arg
61	-	-	E3/c.224del/Cys75LeufsX10	E3/c.224del/Cys75LeufsX10
62	-	-	E1/c.31T>C/Trp11Arg	E1/c.31T>C/Trp11Arg
63	-	-	-	-
64	E2/c.257T>C/Leu86Pro	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	-	-
65	I4/c.574+1G>A/splice	I19/c.1946+3G>T/splice*	-	-
66	I18/c.1879-2A>G/splice	I18/c.1879-2A>G/splice	-	-
67	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	E17/c.1618C>T/Gln540X	-	-
68	E14/c.1413C>G/Tyr471X*	Del E22-E23	-	-
69	E18/c.1878G>C/splice (Gln626His)	E18/c.1878G>C/splice (Gln626His)	-	-
70	-	-	E4/c.613_614+2del/splice	E4/c.613_614+2del/splice
71	-	-	-	-
72	E29/c.2951C>A/Thr984Lys	E29/c.2951C>A/Thr984Lys	-	-
73	-	-	E6/c.889G>A/Gly297Arg	-
74	E13/c.1214T>C/Ile405Thr	I14/c.1440-13_1440-1del/splice*	-	-
75	E30/c.*165T>C/UTR	E30/c.*165T>C/UTR	-	-
76	E24/c.2421G>A/Trp807X	E24/c.2421G>A/Trp807X	-	-

* Mutations repeated within the cohort

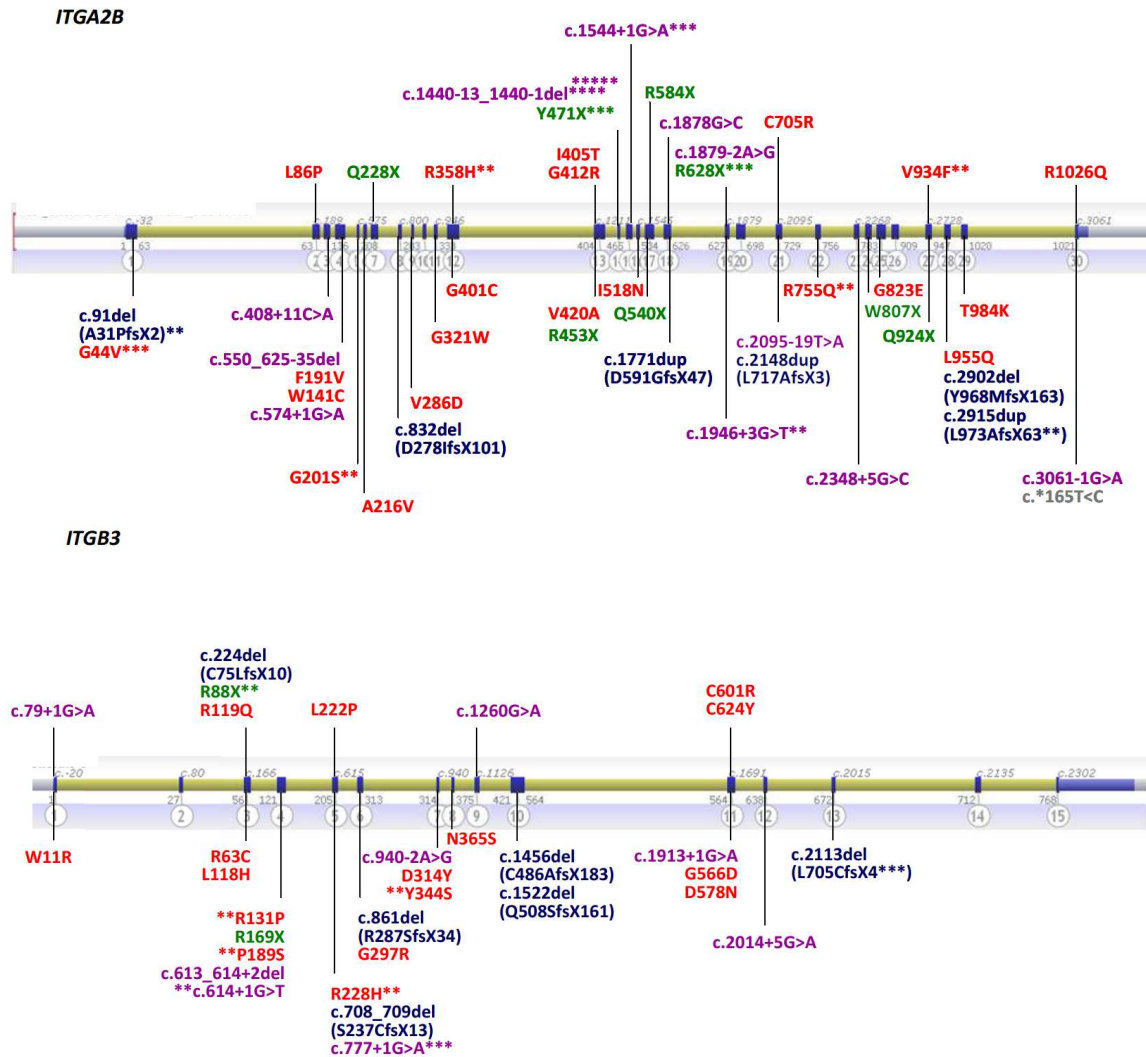


Figure 10. Représentation schématique des gènes *ITGA2B* et *ITGB3* illustrant le spectre des mutations identifiées dans notre série de patients. Dans la partie haute du gène sont représentées les variations génétiques déjà rapportées ; dans la partie basse, les mutations nouvellement rapportées. Les variations sont identifiées par des couleurs en rapport avec leurs types. Les astérisques indiquent les mutations retrouvées à plusieurs reprises chez différents malades au sein de la série de patients.

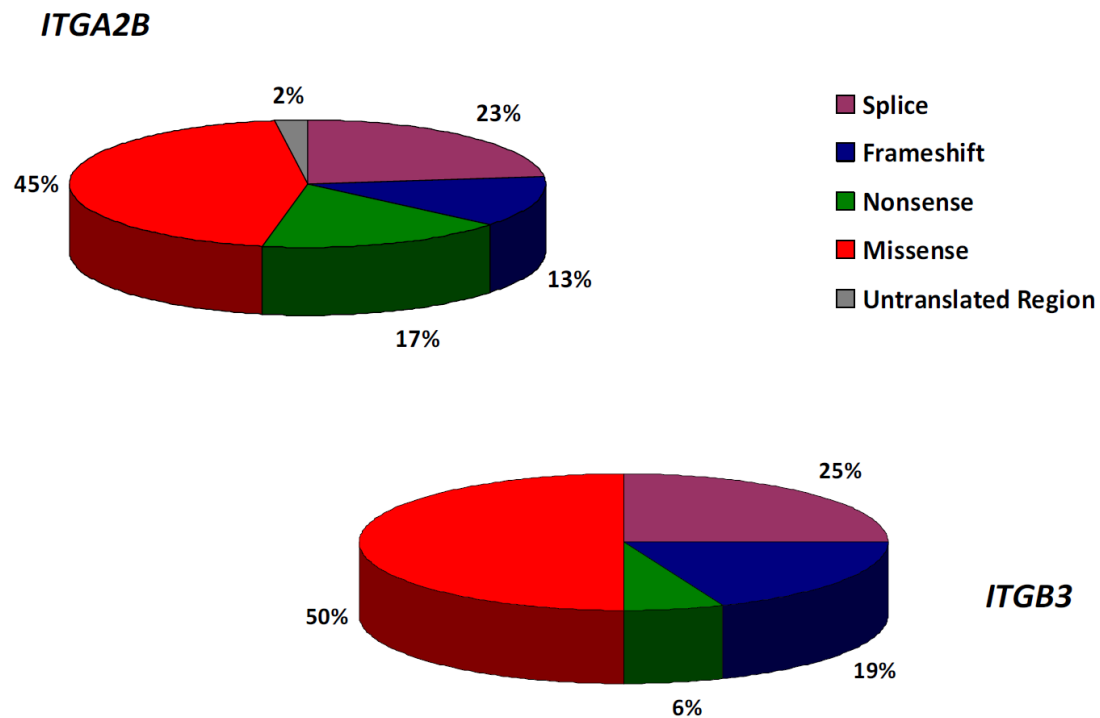


Figure 11. Répartition par types de mutations.

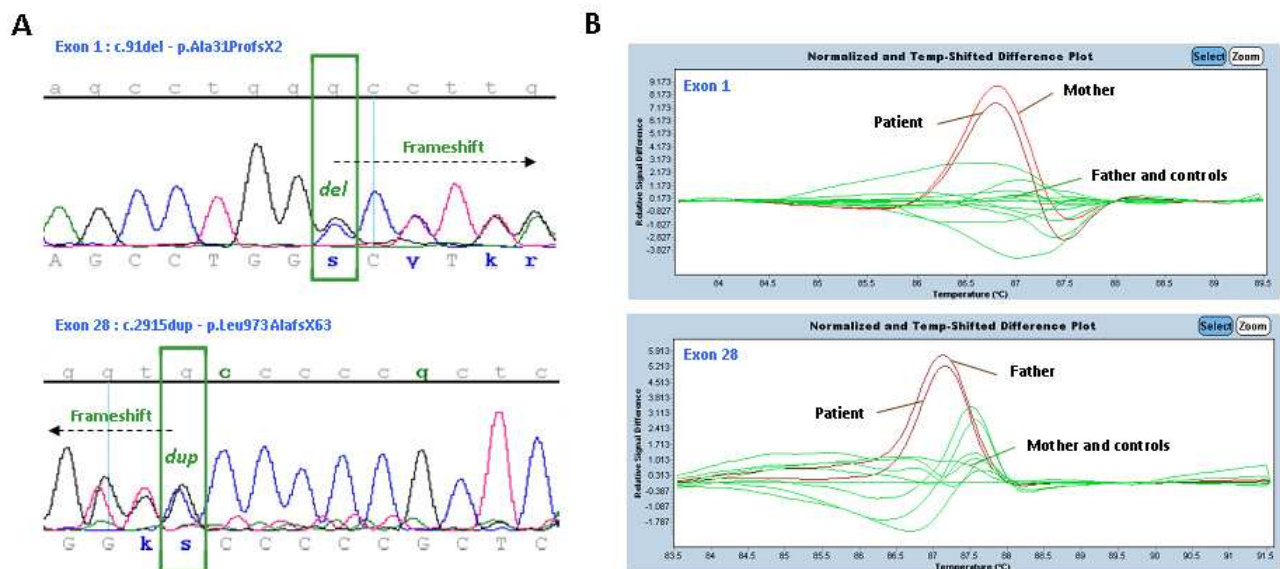


Figure 12. Étude par HRM de la ségrégation familiale de deux nouvelles mutations présentes à l'état hétérozygote dans *ITGA2B*. La partie A (gauche) représente les résultats obtenus par séquençage direct des exons 1 et 28 chez le propositus. La partie B (droite) montre les résultats obtenus par HRM, confirmant que chaque mutation allélique a bien été transmise par chacun des parents.

Il est important de noter que ce travail a également permis de retrouver une seconde mutation chez deux patients pour lesquels une première mutation avait été mise en évidence auparavant par PCR-SSCP (GT9: *ITGB3*, L222P; GT10: *ITGA2B*, R1026Q) [84, 85], permettant ainsi le diagnostic génétique définitif de la maladie.

La nomenclature des mutations faux-sens utilisée dans les sections suivantes fait apparaître entre parenthèse la nomenclature sans le peptide signal, soit 31 résidus en moins pour la sous-unité α_{IIIb} et 26 résidus en moins pour la sous-unité β_3 .

Mutations tronquantes (Tableau IV)

Environ un quart des mutations détectées étaient des micro-insertions/délétions ou des mutations non-sens, incompatibles avec la synthèse d'une protéine normale. Elles n'apparaissaient pas dans un ou plusieurs exons, mais étaient réparties de manière diffuse sur les deux gènes (Fig. 10). Sur la base de nos recherches, nous avons pu déterminer que 73% (16/22) d'entre elles n'avaient jamais été décrites auparavant (Tableau IV). Dix mutations étaient des mutations non-sens et 12 étaient des délétions ou duplications.

À l'exception de deux mutations présentes dans *ITGA2B*, la plupart des variations retrouvées avaient pour probable effet d'entraîner la dégradation rapide de l'ARNm synthétisé (nonsense-mediated mRNA decay), et pour principale conséquence de provoquer une absence d'expression du complexe protéique. Les mutations c.2902del/p.Tyr968Metfs*163 et c.2915dup/p.Leu973Alafs*63 permettaient probablement

Tableau IV. Liste des 22 mutations tronquantes

Gene	Exon	Mutation	In silico prediction			References
			NMD ¹	Splicing defect ²		
ITGA2B	E1	c.91del	p.Ala31Profs*2 (A-1Pfs*2)	Yes	-	-
	E7	c.682C>T	p.Gln228* (Q197*)	Yes	-	Peretz, Human Mut, 2006
	E8	c.832del	p.Asp278Ilefs*101 (D247Ifs*101)	Yes	-	-
	E13	c.1357C>T	p.Arg453* (R422*)	Yes	-	-
	E14	c.1413C>G	p.Tyr471* (Y440*)	Yes	-	Jallu, Human Mut, 2010
	E17	c.1618C>T	p.Gln540* (Q509*)	Yes	-	-
	E17	c.1750C>T	p.Arg584* (R553*)	Yes	No	Tomiyama, Thromb Haemost, 1995
	E18	c.1771dup	p.Asp591Glyfs*47 (D560Gfs*47)	Yes	-	-
	E19	c.1882C>T	p.Arg628* (R597*)	Yes	No	Arias-Salgade, Thromb Haemost, 2002
	E21	c.2148dup	p.Leu717Alafs*3 (L686Afs*3)	Yes	-	-
	E24	c.2421G>A	p.Trp807* (W776*)	Yes	-	-
	E27	c.2770C>T	p.Gln924* (Q893*)	Yes	-	-
ITGB3	E28	c.2902del	p.Tyr968Metfs*163 (Y937Mfs*163)	No	-	-
	E28	c.2915dup	p.Leu973Alafs*63 (L942Afs*63)	No	-	-
	E3	c.224del	p.Cys75Leufs*10 (C49Lfs*10)	Yes	-	D'Andrea, Thromb Haemost, 2002
	E3	c.262C>T	p.Arg88* (R62*)	Yes	-	Peretz, Human Mut, 2006
	E4	c.505C>T	p.Arg169* (R143*)	Yes	-	-
	E5	c.708_709del	p.Ser237Cysfs*13 (S211Cfs*13)	Yes	-	-
	E6	c.861del	p.Arg287Serfs*34 (R261Sfs*34)	Yes	-	-
	E10	c.1456del	p.Cys486Alafs*183 (C460Afs*183)	Yes	-	-
	E10	c.1522del	p.Gln508Serfs*161 (Q482Sfs*161)	Yes	-	-
	E13	c.2113del	p.Leu705Cysfs*4 (L679Cfs*4)	Yes	-	-
	Nonsense-mediated decay					

¹Nonsense-mediated decay²Un effet sur l'épissage a été étudié lorsque les mutations exoniques se situaient à moins de 5 pb d'une jonction exon-intron

la synthèse d'une protéine de taille presque normale, mais avec des séquences C-terminales totalement aberrantes. De manière intéressante, bien que la variation c.2915dup/p.Leu973Alafs*63 était associée à une autre mutation tronquante (c.91del/p.Ala31Profs*2), une expression résiduelle du complexe à la surface des plaquettes des patients (GT41a et GT41b) a pu être observée (environ 5%), probablement du fait que la plupart du domaine extra-cellulaire persistait au sein de cette protéine anormale.

Mutations du site d'épissage (Tableau V)

Dix neuf mutations (11 dans *ITGA2B* et 8 dans *ITGB3*), représentant environ un quart des variations génétiques identifiées, avaient comme probable effet d'abolir un site consensus d'épissage. Ces mutations étaient réparties de manière diffuse sur les deux gènes et 13 d'entre elles n'avaient jamais été rapportées. Malheureusement, l'étude de l'ARNm plaquettaire est une technique très délicate et pour déterminer l'effet pathogène de ces variations génétiques, nous avons fait appel à cinq méthodes différentes d'analyse *in silico*. Les erreurs d'épissage pouvaient conduire à un saut de l'exon ou à l'activation de sites cryptiques d'épissage. Dans la majorité des cas, ces anomalies conduisaient à des délétions ou des insertions au sein du transcrit, induisant des décalages du cadre de lecture et l'apparition de codons stop prématurés. Au total, l'ARNm produit était probablement très rapidement dégradé (nonsense-mediated mRNA decay) et chez ces patients, l'expression d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ était franchement diminuée.

Mutations exoniques altérant l'épissage. Parmi les mutations faux-sens rapportées, trois d'entre-elles étaient situées à la jonction d'intron-exon. Les mutations c.1878G>C/ p.Asp585_Gln626del dans *ITGA2B* et c.1260G>A/ p.Lys376_Thr420del dans *ITGB3* avaient déjà été rapportées et étudiées auparavant, montrant qu'elles étaient responsables

d'une altération de l'épissage entraînant un saut d'exon [86, 87]. Nous avons retrouvé dans *ITGA2B* une nouvelle variation ponctuelle exonique (c.571T>G) qui pouvait également interférer sur l'épissage (Fig. 13). Il s'agissait du patient GT57 atteint d'une forme de type I de la maladie. Cette variation était d'autant plus intrigante que les logiciels de prédiction faisaient de la mutation faux-sens Phe191Val, une mutation peu délétère, alors que les logiciels de prédiction d'épissage en faisaient, une variation pouvant interférer avec l'épissage de l'exon 4 d'*ITGA2B* (Fig 13A,B). Nous avons donc vérifié cette hypothèse par une technique de minigène sur des cellules Cos-7. Les transcrits exprimés présentaient une taille similaire entre le minigène sauvage et celui muté, mais le séquençage du transcrit muté montrait qu'il existait une délétion de 4 pb (Fig. 13E), responsable d'un décalage du cadre de lecture et de l'apparition d'un codon stop prématuré. Au total, nos résultats confirment que la transition c.571T>G est une mutation pathogène dont l'effet délétère ne se traduit pas par un changement d'acide aminé, mais par une altération de l'épissage au niveau de l'exon 4 du gène *ITGA2B*.

Mutations du site d'épissage et conservation du cadre de lecture. Quatre nouvelles mutations avaient comme probable effet d'altérer l'épissage, tout en conservant le cadre de lecture de l'ARNm transcrit : les variations c.408+11C>A, c.550_625-35del et c.2348+5G>C dans *ITGA2B* et c.777+1G>A dans *ITGB3*.

La variation c.408+11C>A dans *ITGA2B* pourrait entraîner, en renforçant un site d'épissage cryptique, une insertion de 12 nucléotides à la fin de l'exon 3 (Tableau V), conduisant à l'insertion de quatre résidus entre la Val136 (V105) et l'Ala137 (A106) d' α_{IIb} . Ces acides aminés sont situés dans le deuxième blade du domaine β -propeller, juste en amont d'un pont disulfure Cys138-Cys161, qui pourrait être probablement rompu. Le patient GT22, présentant cette mutation, avait moins de 5% d'expression d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la

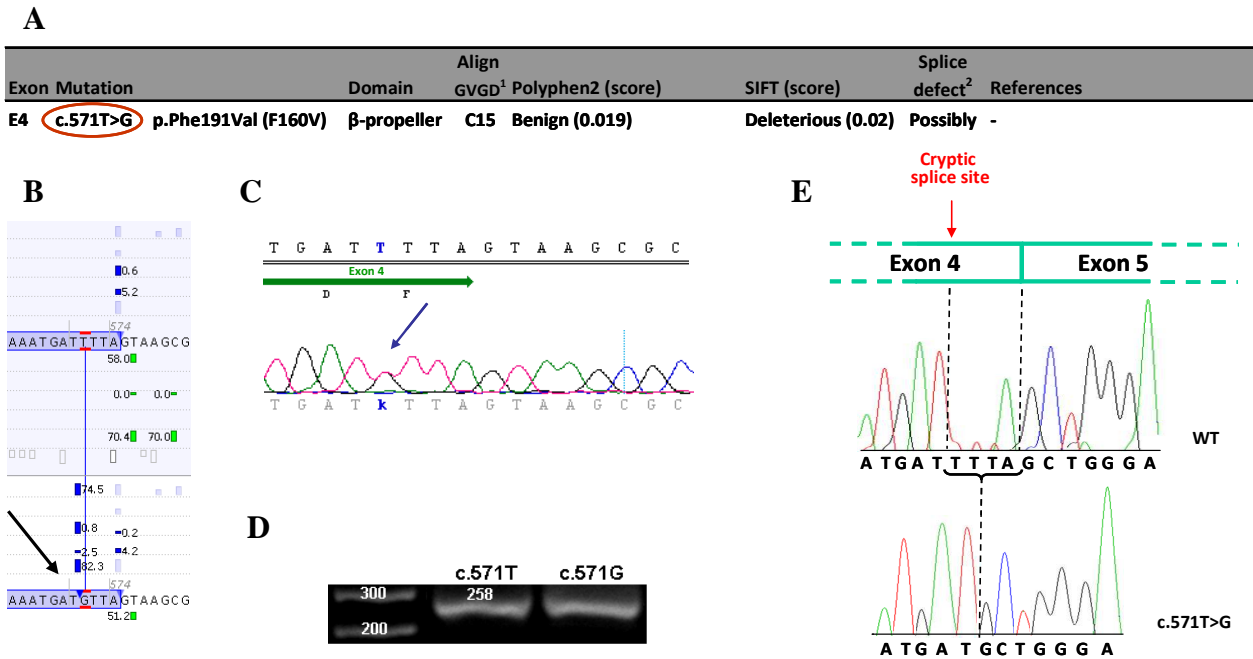


Figure 13. A) Effet de la transition c.571T>G mesurée par différents logiciels de prédiction *in silico*; B) Représentation du site cryptique d'épissage présent 4 pb en amont de la jonction exon-intron du gène *ITGA2B* ; C) Représentation du résultat du séquençage de l'exon 4 du gène *ITGA2B* chez le patient GT57 montrant un remplacement T>G à l'état hétérozygote à la position c.571 (flèche bleue); D) Les produits des PCR obtenus après transfection des minigènes montrent des amplicons de taille similaire; E) Le séquençage des transcrits retrouvent une délétion de 4 pb dans le minigène muté entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré.

surface de ses plaquettes (Tableau III).

La délétion c.550_625-35 induit un saut de l'exon 4 et une délétion de l'exon 5, conduisant à la perte de 72 résidus localisés dans les deuxième et troisième blades du β -propeller.

La variation c.2348+5G>C, présente dans l'intron 23 d'*ITGA2B*, pouvait induire la perte du site d'épissage natif et entraîner un saut de l'exon 23, tout en conservant le cadre de lecture du transcrit (Tableau V). De manière intéressante, cette variation, présente à l'état homozygote, concernait un patient atteint d'une TG de type II. La perte de 28 résidus

et l'insertion d'une arginine, induites par cette mutation, pourrait donc permettre l'association d' α_{IIb} et β_3 et son expression partielle à la surface des plaquettes. L'exon 23 contient les acides aminés 756 à 783 de la sous-unité α_{IIb} et nous avons supposé que ces résidus, présents dans les domaines calf-1 et calf-2 de la protéine, étaient importants, mais pas cruciaux pour la formation et la stabilité du complexe. L'analyse *in vitro* de l'effet de cette variation a donc été entreprise par minigène afin de confirmer tout d'abord l'hypothèse d'une anomalie de l'épissage. L'amplification par PCR des transcrits montraient clairement la synthèse d'un amplicon de taille diminué dans le minigène muté par rapport au minigène sauvage (Fig. 14 B) et le séquençage de ce fragment raccourci a confirmé qu'il y avait bien une délétion de l'exon 23 (Fig. 14 C). Afin de mieux comprendre et d'étudier l'effet de la délétion de cet exon sur la formation du complexe, nous avons exprimé celui-ci, après mutagénèse dirigée, dans des cellules Cos-7 (Fig. 15). L'expression du complexe à la surface des cellules Cos-7, mesurée par CMF, était quasi nulle et l'analyse par WB du contenu cellulaire montrait un blocage complet de maturation de la sous-unité α_{IIb} induite par la délétion de l'exon 23 (Fig. 15 A et C). Ces résultats n'expliquent donc pas pourquoi il persistait chez le patient une expression résiduelle du complexe à la surface de ses plaquettes. En utilisant des primers spécifiques, nous avons vérifié s'il persistait une expression du transcrit normal dans le minigène muté, et celui-ci a été retrouvé à l'état de trace (Fig. 14D). Nous en avons alors déduit que probablement persistait une expression résiduelle d'un complexe normal dans les plaquettes du malade, du fait d'un épissage normal partiellement conservé.

Tableau V. Variations du site d'épissage observées dans cette étude

Gene	I/E ¹	Mutation	Native splice site			Cryptic splice site and protein modification							References
			SSF ² [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSplice [0-1]	GeneSplicer [0-15]	HSF [0-100]	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSplice [0-1]	GeneSplicer [0-15]	HSF [0-100]	
ITGA2B	I3	c.408+11C>A	=68	=3	—	2.5→2	=81.8	60→69	4→7	→0.9	6→8	71→75	—
								Cryptic SS ³ 12 bp upstream : r.[408_409ins408+1_408+12 ; 408+11 C>A] = p.Val136_Ala137InsValGlyProGlu					—
	E4	c.550	70→—	4→—	0.6→—	5→—	80.5→—	—	—	—	—	—	—
			Loss of the native splice site					Exon 4-5 skipping = p.Cys138_Ala209del	—	→0.8	→2.5	→82	—
	E4	c.571T>G	=69.5	= 4.41	0.6→—	5→4	= 80.52	→75	—	→0.8	→2.5	→82	—
								Cryptic SS 4 bp downstream : r.(571_574del) = p.Phe191AlafsX32					—
	I4	c.574+1G>A	70→—	4→—	0.6→—	5→—	80.5→—	—	—	—	—	—	—
			Loss of the native splice site					Exon 4 skipping = p.Cys138GlyfsX31	—	→0.5	—	76→84	Jallu, Human Mut, 2010
	I14	c.1440-13	80→—	7→—	0.7→—	6→—	88→—	68→75	→2	→0.5	—	76→84	—
			Loss of the native splice site					Cryptic SS 2 bp upstream : r.(1440_1441del) = p.Arg480SerfsX106	—	→0.5	—	76→84	—
	I15	c.1544+1G>A	82→—	8→—	0.8→—	7→—	92→—	=68	=3.6	—	5→4.6	=81	Schlegel, Blood, 1995
			Loss of the native splice site					Cryptic SS 8 bp downstream : r.(1537_1544del) = p.Val513LeufsX71	—	—	—	—	Jallu, Human Mut, 2010
E18	c.1878G>C	85→72	10→3	0.9→—	10→6	90→79	—	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					Exon 18 skipping = p.Asp585_Gln626del	—	—	—	—	—	
I18	c.1879-2A>G	75→—	8→—	—	6→—	81→—	—	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					Exon 19 skipping = p.Thr627AspfsX11	—	—	—	—	—	
I19	c.1946+3G>T	69→64	4→—	—	4→—	73→66	=73.5	=7.8	=0.91	=7.3	=78.4	—	
		Loss of the native splice site					Cryptic SS 38 bp downstream : r.(1912_1946del) = p.Val638AspfsX11	—	—	—	—	—	
I20	c.2095-19T>A	=78	4→3	—	3→—	=83	→91	→10	→1	→11.5	→87	—	
							Cryptic SS 17 bp downstream : r.(2094_2095ins2095-17_2095-1) = p.Gly699GlyfsX5	—	—	—	—	—	
I23	c.2348+5G>C	81→68	7→—	0.6→—	7→3	91→79	—	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					Exon 23 skipping= p.Ser756_Gly783delInsArg	—	—	—	—	—	
I29	c.3061-1G>A	80→—	10→—	0.9→—	7→—	90→—	→65	→0.9	—	—	→78	—	
		Loss of the native splice site					Cryptic SS 1 bp upstream : r.(3061delG) = p.Val1021SerfsX110	—	—	—	—	—	
I1	c.79+1G>A	93→—	10→—	1→—	12.5→—	97→—	=65	=2	—	2→5	=80	Sapoznik, ISTH congress, 2009	
		Loss of the native splice site					Cryptic SS 4 bp upstream : r.[79_80ins79+1_79+4 ; 79+1G>A] = p.Gly27AspfsX29	—	—	—	—	—	
I4	c.614+1G>T	75→—	9→—	1→—	5→—	80→—	Exon 4 skipping = p.Asp121ValfsX2	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					=80.5	=6	=0.6	—	=88	—	
I5	c.777+1G>A	80→—	8→—	0.85→—	5→—	86→—	Cryptic SS 27 bp upstream : r.[777_778ins777+1_777+27 ; 777+1G>A] = p.Asp259_Glu260insMSLEDLECCQ	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					=90	=6	—	=6.5	=87	—	
I6	c.940-2A>G	85→—	8→—	1→—	9→—	83→—	Cryptic SS 67 pb en aval : r.(940_1006del) = p.Asp314X	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					Exon 9 skipping = p.Lys376_Thr420del	—	—	—	—	—	
E9	c.1260G>A	80→70	9→3.5	1→—	7→3	91→81	=82	=8	=0.8	=4	=88	Jin, J Clin Invest, 1996	
		Loss of the native splice site					Cryptic SS 38 pb en aval : r.[1913_1914ins1913+1_1913+38 ; 1913+1G>A] = p.Lys639X	—	—	—	—	—	
I11	c.1913+1G>A	81→—	8→—	0.8→—	6.5→—	86.5→—	—	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					Exon 12 skipping = p.Glu639GlyfsX12	—	—	—	—	—	
I12	c.2014+5G>A	75→63	8→—	1→—	2→—	83→71	—	—	—	—	—	—	
		Loss of the native splice site					—	—	—	—	—	—	

¹I: intron; E: exon

²Méthodes utilisées afin de prédire les effets sur l'épissage. SSF: Splice Site Finder-like; MaxEnt: MaxEntScan; HSF: Human Splicing Finder

³SS : splice site

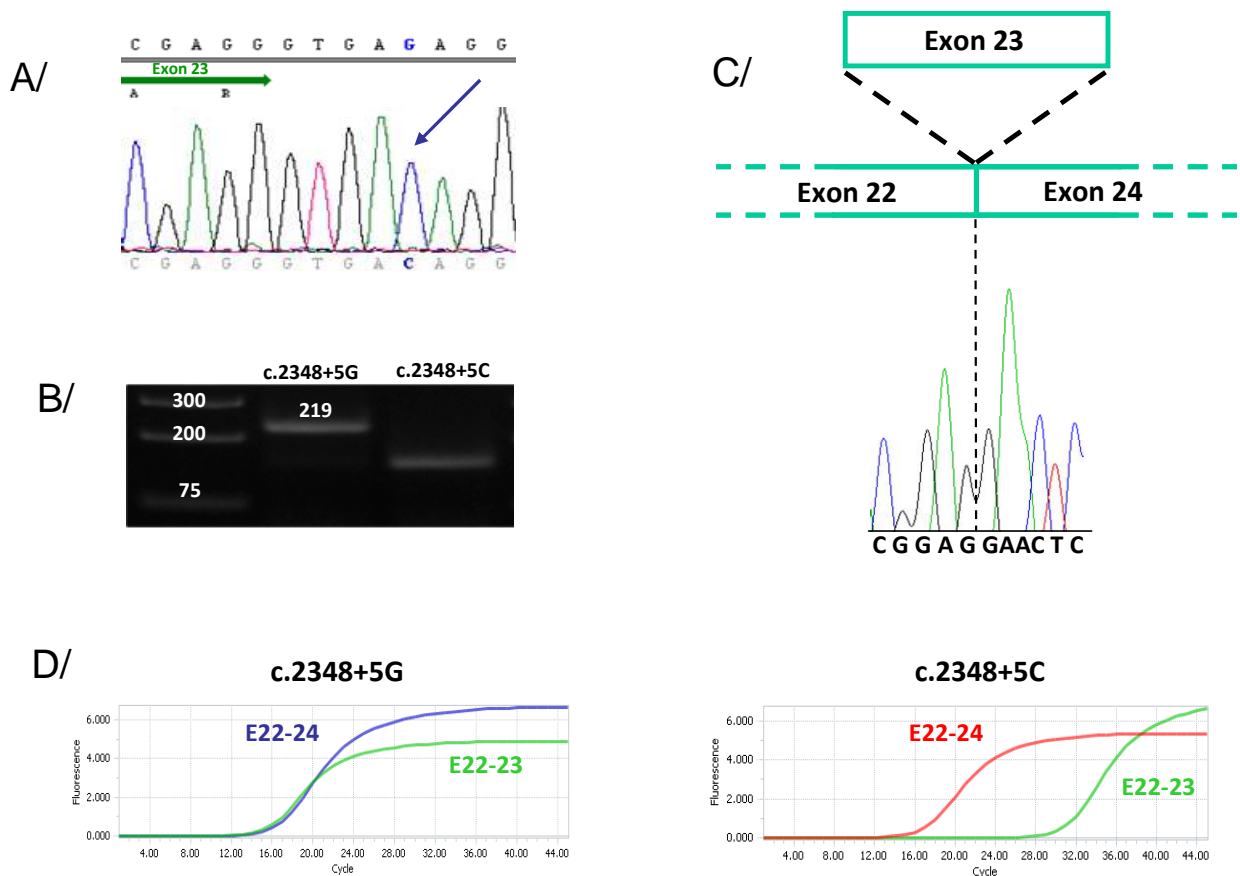


Figure 14. Analyse *in vitro* de l'effet pathogène de la mutation c.2348+5G>C identifiée dans *ITGA2B* chez un patient présentant une TG de type II. A/ Résultat du séquençage de l'ADN du patient révélant une transition homozygote c.2348+5G>C. B/ Après transfection des minigènes dans des cellules Cos-7, un produit de 219 pb a été observée pour la forme sauvage, alors que pour le minigène muté, un transcrit d'une taille plus courte était obtenue. C/ Séquençage du cDNA muté montrant une délétion de l'exon 23. D/ Á l'aide de primers spécifiques et par PCR en temps réel, nous avons mesuré semi-quantitativement l'expression des différents transcrits dans les minigènes. *Courbe bleue.* Transcrit normal amplifié avec des primers spécifiques des exons 22 et 24. *Courbe rouge.* Transcrit anormal amplifié à l'aide de primers spécifiques des exons 22 et 24. *Courbes vertes.* Transcrits normaux amplifiés à l'aide de primers spécifiques des exons 22 et 23, montrant une expression à l'état de trace du transcrit normal dans le minigène muté.

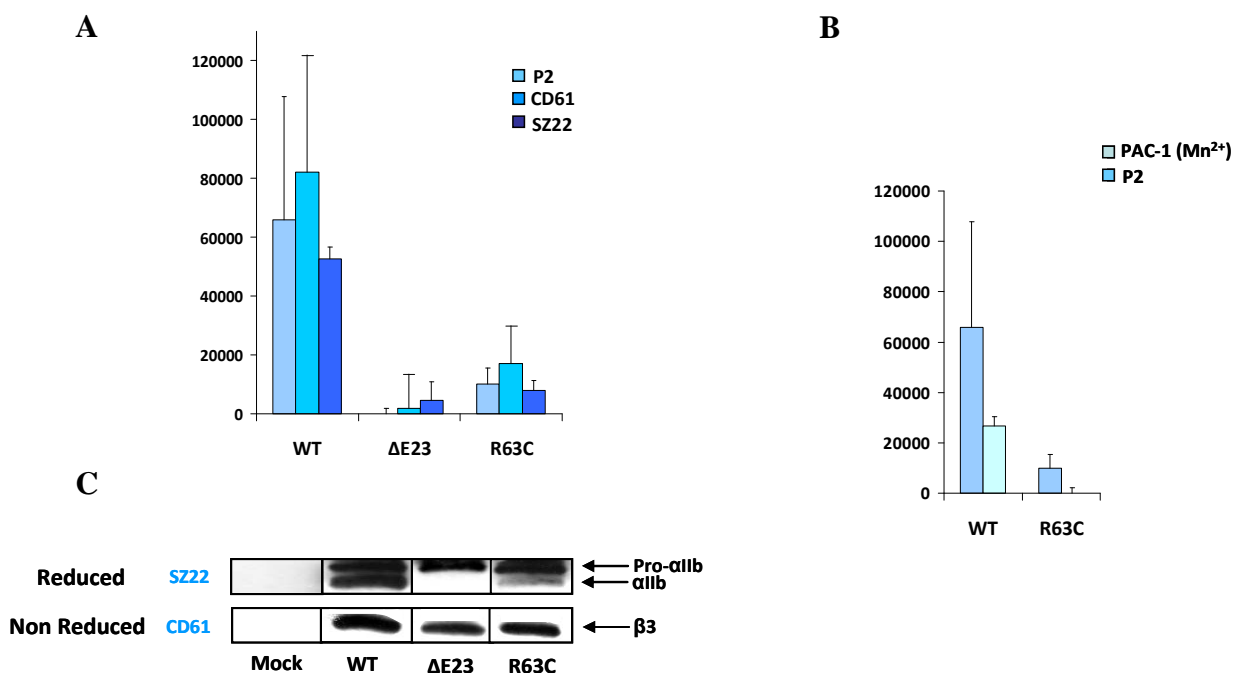


Figure 15. A) Analyse par cytométrie en flux de cellules Cos-7 transfectées. Les histogrammes représentent les résultats obtenus à partir de cellules Cos-7 transfectés avec les cDNA d' α_{IIb} et β_3 (WT), avec le cDNA d' α_{IIb} muté ($\Delta E23$: délétion de l'exon 23) et le cDNA normal de β_3 , et enfin le cDNA muté de β_3 (R63C) et le cDNA normal d' α_{IIb} . Les MFI sont exprimés sous la forme de moyennes \pm e.t. (n= 3). B) Étude de la fonction du complexe, à l'aide de l'anticorps PAC-1, après activation par du Mn^{2+} , montrant un défaut de fonction du complexe muté ($\beta_3 R63C$) ; C) Identification par Western-Blot des sous-unités α_{IIb} et β_3 dans des cellules Cos-7, en condition réduite ou non.

Enfin, la dernière variation intronique c.777+1G>A, présente dans *ITGB3*, survenait en position +1 après l'exon 5. Cette mutation pouvait entraîner un gain de 27 nucléotides à la suite de cet exon, et créer une insertion de neuf résidus (p.Asp259_Glu260insMSLEDLECQ) dans le domaine β -I de la sous-unité β_3 , domaine essentiel à l'association des deux sous-unités.

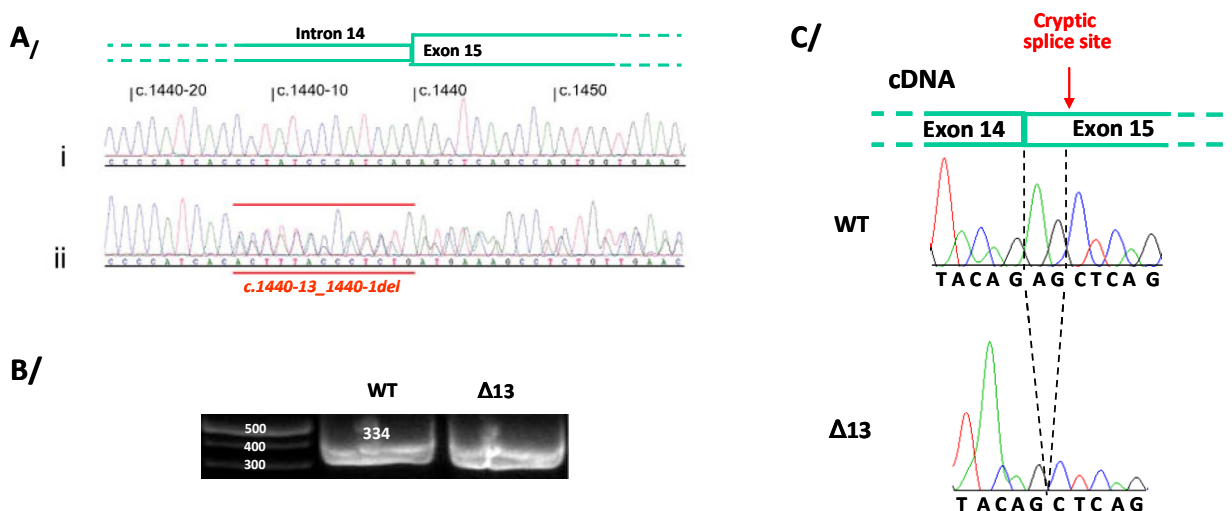


Figure 16. Analyse de l'effet sur l'épissage par une technique de minigène de la mutation c.1440-13_c.1440-1del identifiée dans *ITGA2B*. A/ Résultat du séquençage de l'ADN d'un des patients retrouvant une délétion de 13 pb à l'état hétérozygote juste en amont de l'exon 15. B/ Produits d'amplification des transcrits générés dans les cellules Cos-7, retrouvant des tailles d'amplicons similaires. C/ Séquençage direct des cDNA obtenus montrant une délétion de deux pb dans le transcrit muté résultant de l'utilisation d'un site d'épissage cryptique.

Délétion récurrente de 13 pb dans l'intron 14 d'ITGA2B. La variation génotypique la plus fréquemment retrouvée (7 familles) était une délétion intronique de 13 pb (c.1440-13_c.1440-1del) (Tableau III). Comme cette mutation concernait des patients d'origine différente, l'hypothèse la plus probable de son origine était celle d'un « hot spot » mutationnel. Dans un article précédemment publié, nous avons montré que cette mutation pouvait éventuellement affecter l'épissage du gène *ITGA2B* en activant un site normalement cryptique [88]. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé une technique par minigène sur cellules Cos-7 (Fig. 16). Les résultats montraient effectivement l'apparition d'un nouveau site d'épissage entraînant une délétion de 2 pb dans le transcrit muté, conduisant à un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop

prématuré 105 résidus en aval, confirmant définitivement l'effet pathogène de cette variation récurrente.

Mutations faux-sens (Tableau VI)

Sur les 20 mutations faux-sens identifiées dans *ITGA2B*, 12 mutations concernaient le domaine β -propeller, une mutation se situait dans le domaine thigh, six mutations étaient localisées dans les domaines calf-1 et -2 et une mutation concernait le domaine cytoplasmique (Fig. 10, Tableau VI). Sur les 16 mutations identifiées dans *ITGB3*, toutes concernaient la partie extra-cellulaire de la protéine, avec quatre mutations dans les domaines PSI et hybrid, sept mutations dans le domaine β -I, quatre mutations dans les domaines EGF, et une mutation située au niveau du peptide signal.

(a) *Mutations concernant le domaine β -propeller d' α_{IIb} .* Nos résultats confirment que les mutations survenant dans ce domaine sont une cause fréquente de TG. Sur les 12 mutations identifiées, huit mutations n'avaient jamais été rapportées auparavant (Table VI). La plupart des mutations retrouvées dans ce domaine affectaient des structures très conservées de la protéine et la majorité des patients avaient une forme de type I de la maladie. Seulement, trois patients présentaient une forme de type II avec une expression résiduelle du complexe (GT11, GT18 and GT55).

La figure 17 représente les modifications structurales induites par quelques mutations sélectionnées. La plupart des acides aminés impliqués concernaient des structures dont la modification interférait avec l'organisation en feuillet β anti-parallèle des "blades". Quatre nouvelles mutations : la Gly44Val (G13V), la Gly201Ser (G170S),

Tableau VI. Mutations faux-sens identifiées

Gene	Exon	Mutation	Domain	Align GVGD ¹	Polyphen2 (score)	SIFT (score)	References
<i>ITGA2B</i>	E1	c.131G>T	p.Gly44Val (G13V)	β-propeller	C65	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E2	c.257T>C	p.Leu86Pro (L55P)	β-propeller	C65	Probably damaging (0.997)	Deleterious (0.00)
	E4	c.423G>T	p.Trp141Cys (W110C)	β-propeller	C65	Probably damaging (0.926)	Deleterious (0.00)
	E5	c.601G>A	p.Gly201Ser (G170S)	β-propeller	C55	Probably damaging (0.997)	Deleterious (0.00)
	E6	c.647C>T	p.Ala216Val (A185V)	β-propeller	C65	Probably damaging (0.974)	Deleterious (0.00)
	E9	c.857T>A	p.Val286Asp (V255D)	β-propeller	C0	Benign (0.082)	Tolerated (0.07)
	E11	c.961G>T	p.Gly321Trp (G290W)	β-propeller	C65	Probably damaging (1.00)	Deleterious (0.00)
	E12	c.1073G>A	p.Arg358His (R327H)	β-propeller	C25	Probably damaging (0.998)	Deleterious (0.00)
	E12	c.1201G>T	p.Gly401Cys (G370C)	β-propeller	C65	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E13	c.1214T>C	p.Ile405Thr (I374T)	β-propeller	C25	Benign (0.239)	Deleterious (0.02)
	E13	c.1234G>A	p.Gly412Arg (G381R)	β-propeller	C65	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E13	c.1259T>C	p.Val420Ala (V389A)	β-propeller	C65	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E16	c.1553T>A	p.Ile518Asn (I487N)	Thigh	C45	Possibly damaging (0.887)	Deleterious (0.00)
	E21	c.2113T>C	p.Cys705Arg (C674R)	Calf-1	C65	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E22	c.2264G>A	p.Arg755Gln (R724Q)	Calf-1	C0	Possibly damaging (0.537)	Deleterious (0.04)
	E25	c.2468G>A	p.Gly823Glu (G792E)	Calf-2	C65	Possibly damaging (0.879)	Deleterious (0.00)
	E27	c.2800G>T	p.Val934Phe (V903F)	Calf-2	C45	Probably damaging (0.960)	Deleterious (0.00)
	E28	c.2864T>A	p.Leu955Gln (L924Q)	Calf-2	C65	Probably damaging (0.996)	Deleterious (0.00)
	E29	c.2951C>A	p.Thr984Lys (T953K)	Calf-2	C65	Probably damaging (0.994)	Deleterious (0.00)
	E30	c.3077G>A	p.Arg1026Gln (R995Q)	Cytoplasmic	C35	Probably damaging (0.997)	Deleterious (0.00)
<i>ITGB3</i>	E1	c.31T>C	p.Trp11Arg (W-15R)	Signal peptide	C0	Benign (0.163)	Tolerated (0.07)
	E3	c.187C>T	p.Arg63Cys (R37C)	PSI	C0	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E3	c.353T>A	p.Leu118His (L92H)	Hybrid	C0	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E3	c.356G>A	p.Arg119Gln (R93Q)	Hybrid	C0	Possibly damaging (0.871)	Tolerated (0.14)
	E4	c.392G>C	p.Arg131Pro (R105P)	Hybrid	C65	Probably damaging (0.959)	Deleterious (0.00)
	E4	c.565C>T	p.Pro189Ser (P163S)	β-I	C65	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E5	c.665T>C	p.Leu222Pro (L196P)	β-I	C65	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E5	c.683G>A	p.Arg228His (R202H)	β-I	C25	Probably damaging (0.996)	Deleterious (0.00)
	E6	c.889G>C	p.Gly297Arg (G271R)	β-I	C25	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.01)
	E7	c.940G>T	p.Asp314Tyr (D288Y)	β-I	C65	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E7	c.1031A>C	p.Tyr344Ser (Y318S)	β-I	C65	Probably damaging (0.998)	Deleterious (0.00)
	E8	c.1094A>G	p.Asn365Ser (N339S)	β-I	C0	Benign (0.081)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1697G>A	p.Gly566Asp (G540D)	EGF-3	C0	Probably damaging (1.000)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1732G>A	p.Asp578Asn (D552N)	EGF-3	C0	Possibly damaging (0.810)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1801T>C	p.Cys601Arg (C575R)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1871G>A	p.Cys624Tyr (C598Y)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1871G>A	p.Cys624Tyr (C598Y)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1871G>A	p.Cys624Tyr (C598Y)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1871G>A	p.Cys624Tyr (C598Y)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1871G>A	p.Cys624Tyr (C598Y)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)
	E11	c.1871G>A	p.Cys624Tyr (C598Y)	EGF-4	C0	Probably damaging (0.999)	Deleterious (0.00)

¹Algorithmes appliqués afin de prédire l'impact des substitutions faux-sens. Align GVGD: C0 to C65 (neutral to maximal deleterious effect)

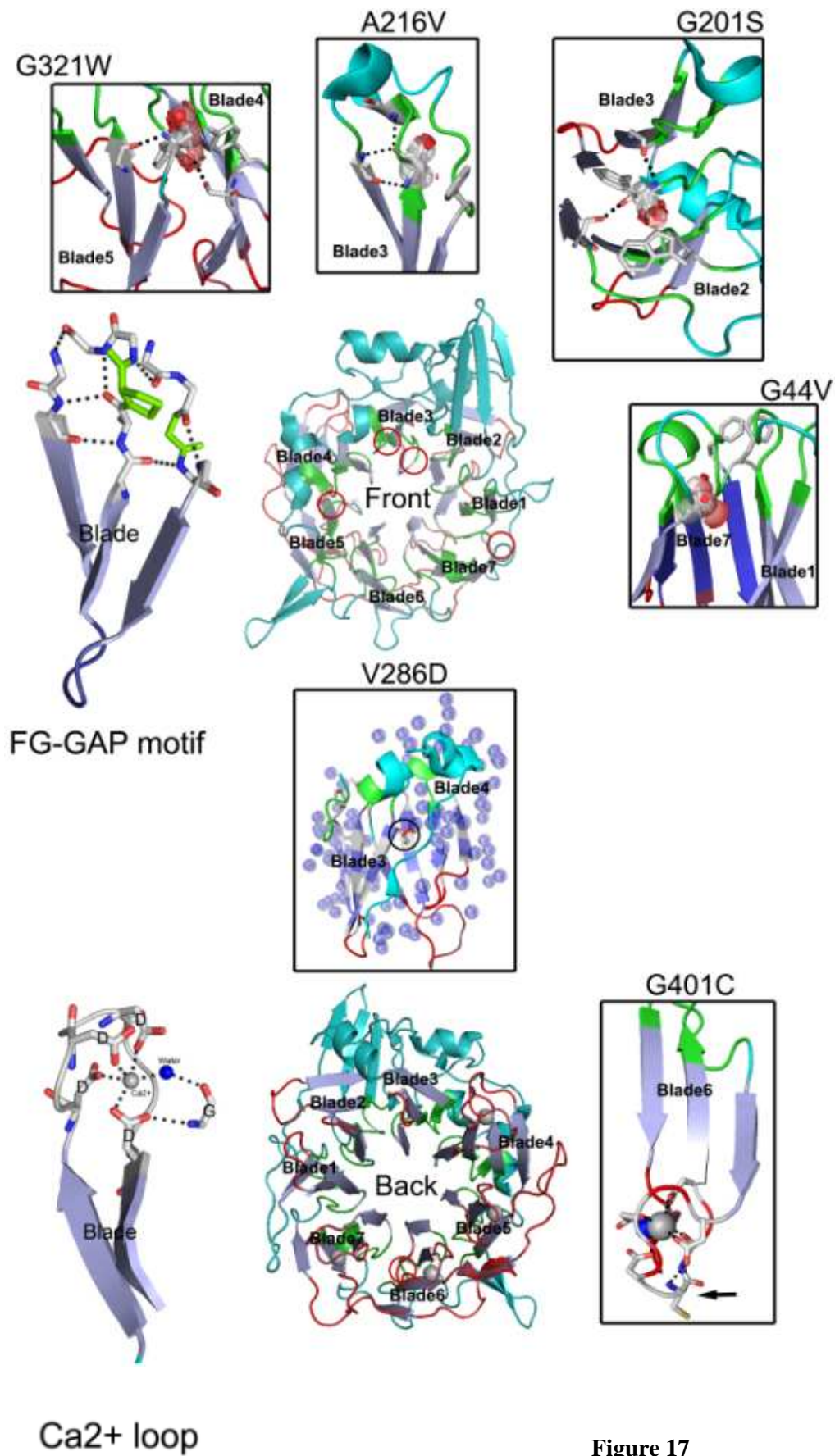


Figure 17

Figure 17. Modélisation 3 D représentant quelques mutations faux-sens présentes dans le domaine β -propeller, vu de face (région en contact avec le domaine β -I de la sous-unité β_3) (en haut) et de dos (en bas). Les feuillets β des blades sont représentés en bleu pâle, les motifs FG-GAP en vert clair et les sites de liaisons du Ca^{2+} en rouge foncé. Sur le côté gauche de la figure, sont représentés plus précisément les motifs FG-GAP et les sites de liaisons du Ca^{2+} . Les cercles rouges au centre de la figure correspondent aux acides aminés substitués. Les changements structuraux induits par la Gly44Val (G13V), la Gly201Ser (G170S), l'Ala216Val (A185V) et la Gly321Trp (G290W) touchant des motifs FG-GAP sont présentés dans le haut de la figure. La G44V induit un encombrement stérique (disques rouges) responsable de la rupture de liaisons H (lignes pointillées). Des changements similaires sont observés pour la G201S, l'A216V et la G321W. La Val286Asp (V255D, au centre) survient dans le core du blade 4 et cette substitution autorise l'accès aux molécules d'eau (sphères bleues) qui rompt des liaisons H et entraîne des modifications importantes de la structure du β -propeller. La Gly401Cys (G370C) survient à proximité d'un site de liaison du Ca^{2+} comprenant quatre acides aspartiques (l'atome de calcium est représenté sous la forme d'une sphère grise) et le changement structural entraîne la perte d'une liaison H. Les acides aminés engagés dans des liaisons H (lignes pointillées) apparaissent sous la forme de bâtonnets avec les atomes C en blanc, les atomes N en bleu, les atomes O en rouge et les atomes S en orange.

l'Ala216Ser (A185S) et la Gly321Trp (G190W) concernaient des motifs « FG-GAP », empêchant l'interaction des sous-unités α_{IIB} et β_3 .

Le remplacement d'une glycine par une valine à la position 44 (G13V) provoque une interférence stérique empêchant les blades 1 et 7 d'interagir correctement entre eux, ce que nous avons confirmé par modélisation dynamique. En effet, celle-ci retrouvait une forte instabilité de l'intégrine induite par cette mutation, se traduisant par une augmentation importante des RMSD en présence de Ca^{2+} (Fig. 18).

Les substitutions suivantes : Gly201Ser, Ala216Ser et Gly321Trp rompaient des liaisons hydrogènes indispensables à la structure des blades. En effet, les résidus hydrophobes sont présents en excès dans les blades, et plus particulièrement ceux situés au centre de la structure du β -propeller. L'exclusion des molécules d'eau permet de conserver les liaisons hydrogènes qui structurent le domaine en feuillets β anti-parallèles.

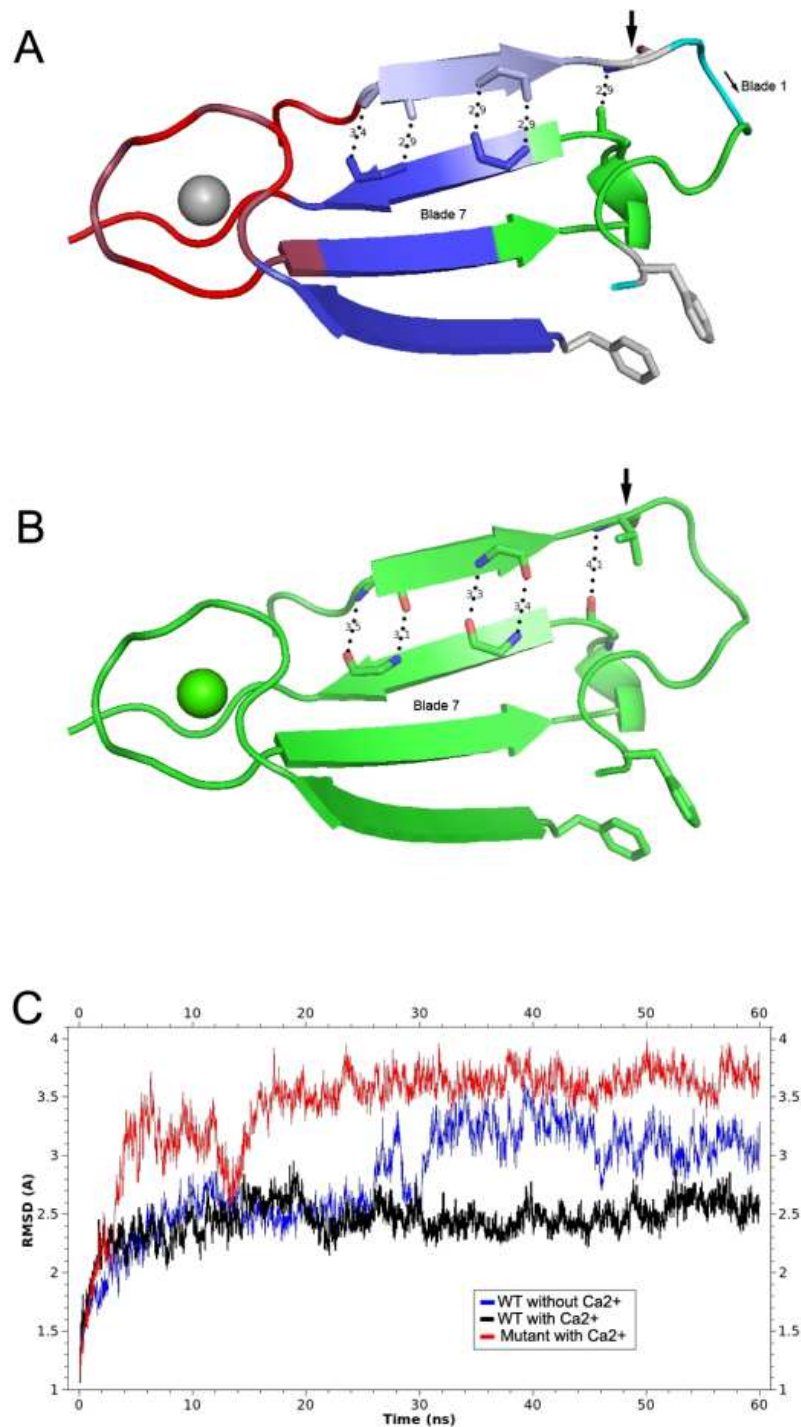


Figure 18. (A) Vue sélective des blades 1 et 7 avec la chaîne latérale de la Gly44 (flèche). (B) Le remplacement d'une glycine par une valine à la position 44 (G13V) provoque une interférence stérique empêchant les blades 1 et 7 d'interagir entre eux et entraînant leur éloignement, alors qu'ils sont censés refermer la structure du β -propeller ; En (C) est représenté le RMSD (root mean square deviation, en Å) traduisant l'amplitude des mouvements de la protéine, et donc son instabilité, en fonction du temps (en ns) pour les formes sauvages (Gly44) en présence de Ca^{2+} ou non, ainsi que pour la forme mutée (Val44).

La mutation Val286Asp (V255D) introduit un élément plus polaire dans cet environnement hydrophobe provoquant la déstabilisation de la structure et augmentant notamment l'écart entre les blades 3 et 4 (Fig. 17). Ainsi, les molécules d'eau, qui ont accès à cette structure normalement protégée, vont déstabiliser les liaisons hydrogènes existantes. De façon surprenante, ce changement d'acide aminé n'apparaît pas comme délétère selon les logiciels de prédiction *in silico* que nous avons utilisés (Tableau VI). Cet acide aminé apparaît peu conservé entre les espèces, mais l'introduction d'un acide aspartique, dont l'écart physico-chimique avec la valine est très important, semble le plus déterminant.

La mutation Val420Ala (V389A) a un effet similaire à la Val286Asp, mais cette fois-ci, ce sont les blades 6 et 7 qui sont repoussés.

Enfin, concernant la Gly401Cys, le mécanisme pathogène est différent. En effet, ce changement d'acide aminé se situe au niveau d'un site de fixation du Ca^{2+} très conservé qu'elle va perturber en empêchant la formation d'une liaison hydrogène avec un acide aspartique.

(b) *Mutations affectant les domaines « thigh » et « calf » d' α_{IIb} .* Sur les sept mutations impliquant ces domaines, deux avaient déjà été rapportées dans la littérature : la Cys705Arg (C674R) et la Val934Phe (V903F). La majorité des patients de ce groupe présentaient une TG de type I. La figure 19 représente la modélisation de trois nouvelles mutations identifiées dans le domaine calf-2 : la Gly823Glu (Gly792Glu), la Leu955Gln (Leu924Gln) et la Thr984Lys (Thr953Lys).

La glycine 823 se situe au niveau d'une boucle non-structurée de la protéine reliant deux feuillets constitutifs de calf -2. Son remplacement par un acide glutamique, qui est un acide aminé de plus grande taille, chargé négativement, entraîne un écartement de l'angle

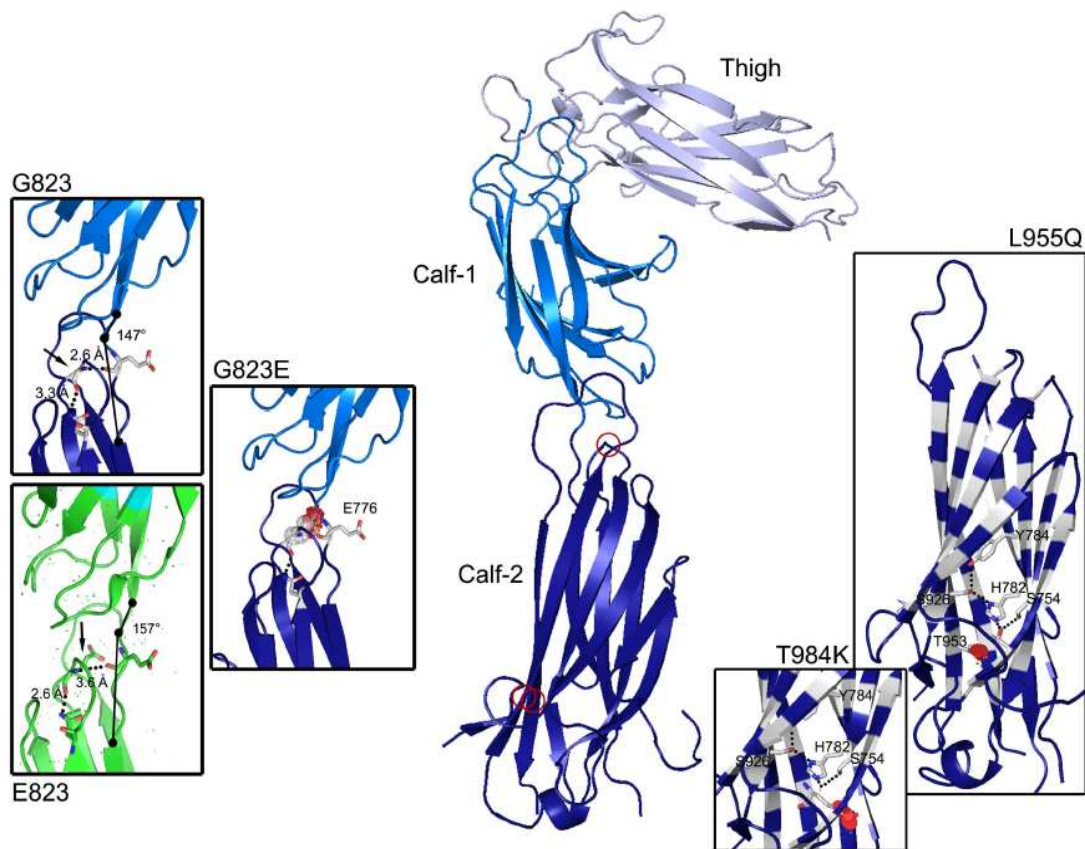


Figure 19. Représentation structurale de trois nouvelles mutations faux-sens identifiées dans le domaine calf-2. Les localisations des acides aminés concernés sont représentées par des cercles rouges. Les atomes C apparaissent en blanc, les atomes N en bleu, les atomes O en rouge et les atomes S en orange. Les encombrements stériques sont représentés par des disques rouges. Les acides aminés engagés dans des liaisons H (lignes pointillées) apparaissent sous la forme de bâtonnets. L'E823 écarte l'angle formé par les domaines calf-1 et -2 et augmente la distance avec l'E776. Á droite de la figure est représentée la structure en forme de tonneau du domaine calf-2, composé de 9 feuillets β anti-parallèles. La L995Q et la T984K entraînent la rupture d'un motif composé de cinq résidus polaires partageant des liaisons H dans une région très hydrophobe.

formé par ces deux domaines et provoque un redressement de la partie distale du bras long d' α_{IIb} .

Les substitutions Leu955Gln et Thr985Lys surviennent à proximité d'une séquence conservée de cinq résidus polaires et organisés autour de liaisons hydrogènes. Ces mutations introduisent un encombrement stérique qui rompt ces liaisons hydrogènes et entraîne une perte de rigidité de la structure hydrophobe et en forme de « tonneau » du domaine calf-2.

(c) *Mutations faux-sens affectant la sous-unité β_3* . Quinze mutations ont été identifiées au niveau de la partie extra-cellulaire de la protéine, alors qu'une mutation affectait le peptide signal (Fig. 10). Onze de ces mutations étaient nouvelles, l'Arg119Gln (Arg93Gln), la Leu222Pro (Leu196Pro), la Cys601Arg (Cys575Arg) et la Cys624Tyr (Cys598Tyr), ayant déjà été rapportées dans la littérature.

La mutation Arg63Cys (R37C), située dans le domaine PSI de la protéine et retrouvée chez un patient présentant un phénotype de type II (GT7), était particulièrement intéressante. Dans la structure tertiaire de la protéine, cet acide aminé polaire se situe à proximité de la Cys52, qui forme elle-même un pont disulfure avec la Cys75 (Fig. 20). L'introduction d'une cystéine à la position 63 de β_3 rend possible la création d'un pont disulfure avec la Cys52, un réarrangement qui briserait une boucle essentielle à la structure du domaine PSI (Fig. 20). Afin d'évaluer l'effet de cette mutation sur la biogénèse du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$, nous avons co-transfecté transitoirement des cellules Cos-7 avec du cDNA normal codant pour α_{IIb} et du cDNA muté codant pour β_3 . L'analyse par cytométrie en flux des cellules transfectées montrait une réduction de 85% de l'expression du complexe par rapport à la normale (Fig. 15A). D'autre part, après activation du complexe par l'addition de $MnCl_2$, nous n'avons pas mis en évidence de fixation de PAC-1, suggérant que ce

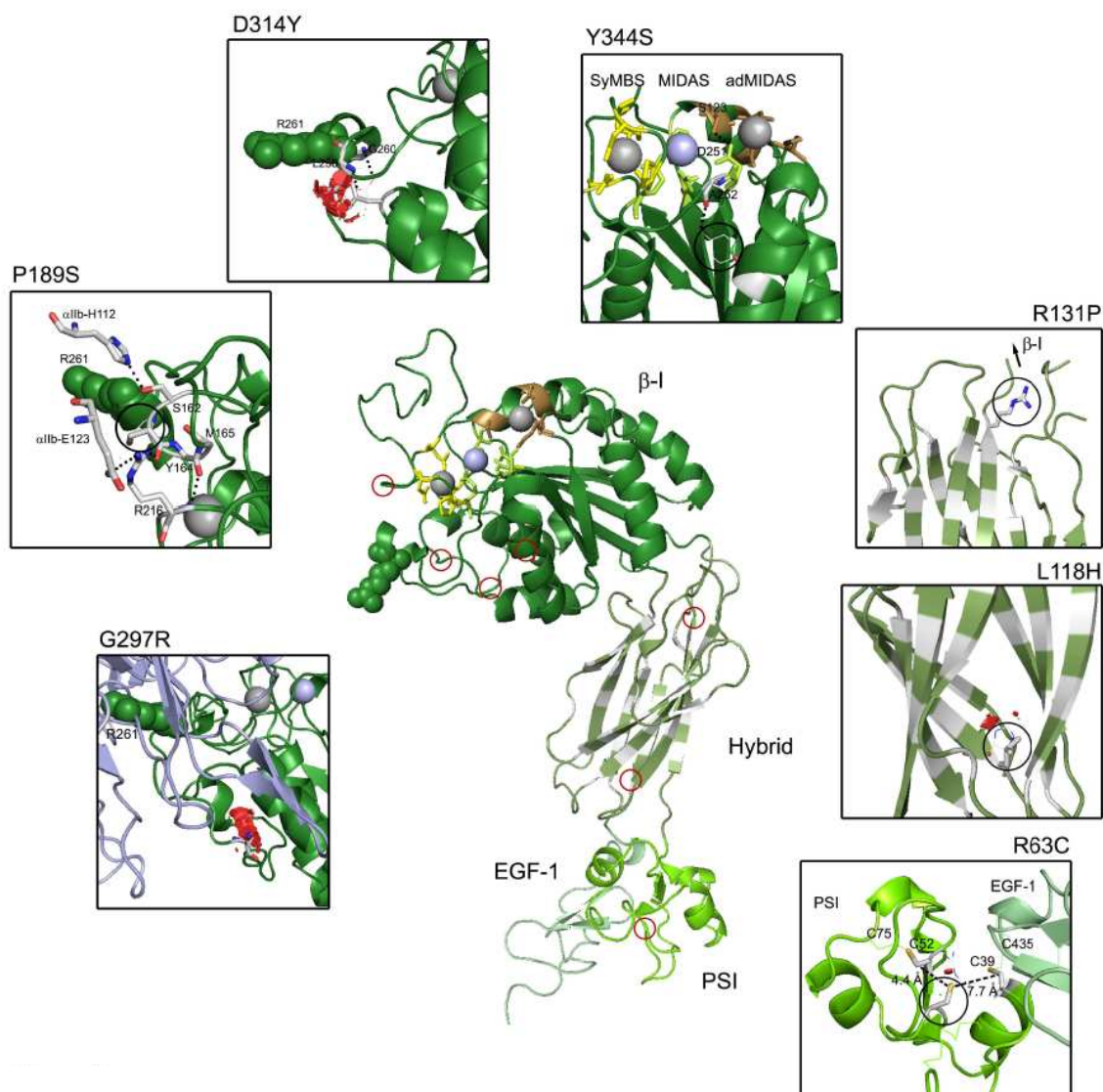


Figure 20. Représentation structurale de certaines mutations faux-sens identifiées dans la partie extra-cellulaire de β_3 . Les résidus du domaine SyMBS sont représentés en jaune, ceux du MIDAS en vert olive et ceux de l'ADMIDAS en marron. Les atomes de Ca^{2+} et de Mg^{2+} sont représentés respectivement sous la forme de sphère grise et de sphère bleu pâle. L'Arg63Cys (R37C), situé dans le domaine PSI, est localisé à proximité de cystéines intervenant dans des ponts disulfures essentielles à la structure de β_3 . L'introduction d'une cystéine à la position 63 rend possible la formation d'un pont disulfure avec la Cys52. L'Arg131Pro (R105P) et la Leu118His (L92H) sont localisées dans le domaine hybrid. L'Arg131Pro introduit une déviation au niveau du segment qui relie le domaine β -I. La Leu118His intervient sur la structure en tonneau du domaine hybrid. Les résidus hydrophobes orientés vers le centre de cette structure sont représentés en blanc sur la figure. La Leu118His introduit un acide aminé polaire au sein de cet environnement hydrophobe et provoque un encombrement stérique, qui donne accès aux molécules d'eau. L'Asp314Tyr (D288Y) et la Pro189Ser (P163S) ont un impact sur l'Arg261 de β_3 (représentée sous la forme de sphères vert foncées), un résidu qui s'insère au cœur de la structure du β -propeller d' α_{IIb} , et dont l'interaction est essentielle à la biogénèse du complexe. L'Asp314Tyr entraîne un encombrement stérique qui repousse la petite hélice qui porte l'Arg261, tandis que la Pro189Ser a une interaction directe avec ce résidu. La Gly297Arg (G271R) introduit également un encombrement stérique. La Tyr344Ser (Y318S) appartient au site de coordination des ions du domaine β -I. Le remplacement de la Tyr344 par une serine plus petite entraîne la perte d'une liaison H structurante (ligne pointillée) avec l'Ala252 (Ala226) en contact avec l'Asp251 (Asp225) du site MIDAS. Les acides aminés engagés dans des liaisons H (lignes pointillées) apparaissent sous la forme de bâtonnets avec les atomes C en blanc, les atomes N en bleu, les atomes O en rouge et les atomes S en orange. Les encombrements stériques sont représentés par des disques rouges.

complexe exprimé de manière résiduelle n'était pas fonctionnel (Fig. 15B). Enfin, l'analyse par WB montrait un excès de la forme immature d' α_{IIb} (pro- α_{IIb}), témoignant d'un blocage de maturation du complexe induit par l'introduction d'une cystéine à la position 63 de β_3 (Fig. 15C). Au total, ces résultats confirment bien l'effet délétère de cette mutation sur la biogénèse et la fonction du complexe, et sont totalement compatibles avec le phénotype du patient.

Le domaine « hybrid » de β_3 est constitué de feuillets β organisés en « tonneau » avec la majorité des acides aminés hydrophobes le constituant orientés vers l'intérieur de la structure (Fig. 20). Deux mutations nouvellement décrites affectaient ce domaine et leur modélisation 3D est représentée sur la figure 20. La Lys118His (L92H) provoque une instabilité de la structure en créant un encombrement stérique, mais aussi en perturbant l'environnement hydrophobe de ce domaine. L'Arg131 (R105) se situe à l'extrémité d'un feuillet β localisé au sommet du domaine hybrid. Son remplacement par une proline entraîne une déviation qui survient juste en amont d'un segment qui relie le domaine β -I de β_3 , domaine essentiel à l'interaction des deux sous-unités.

Par ailleurs, six nouvelles mutations ont été mises en évidence dans le domaine β -I de β_3 . Parmi-elles, la mutation Pro189Ser (P163S) a un impact direct sur le résidu Arg287 (R261) de β_3 qui, en pénétrant dans le core de la sous-unité α_{IIb} , est un acide aminé essentiel à l'interaction des deux sous-unités (Fig. 20). La mutation Asp314Tyr perturbe la petite hélice qui porte le résidu β_3 Arg287, dont l'importance vient d'être évoquée. La mutation Tyr344Ser concerne un acide aminé qui se situe à proximité du site MIDAS et qui interagit avec l'Asp277 par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes. Le remplacement de la Tyr344 par une sérine provoque la rupture de ces liaisons, rendant le site MIDAS instable. Enfin, la mutation Gly297Arg (G271R) introduit un encombrement stérique important au sein de la structure conservée de β -I.

Les domaines EGF de β_3 constituent également des structures où surviennent assez fréquemment des mutations faux-sens. Plus précisément, deux nouvelles mutations ont été identifiées dans le domaine EGF-3 : la Gly566Asp et l'Asp578Asn. Ces deux résidus, très conservés entre les espèces, sont situés à proximité de cystéines engagées dans des ponts disulfures (Fig. 21). Leur remplacement par un autre acide aminé pourrait rompre ces liaisons essentielles à la structure de la protéine.

	566	568	570	573	575	578		584	601
Human	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Chimpanzee	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Macaque	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Mouse	GHGQ	CN	CGD	CV	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Dog	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Cow	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Tatou	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	YYCNC	...LLCSG
Opossum	GHGQ	CS	CGD	CL	CD	SDWT	...	DYCNC	...LLCSG

Figure 21. Alignement de séquences de β_3 à l'aide du logiciel M-Coffee montrant la très forte conservation des acides aminés entre les espèces. En bleu, sont représentés les résidus cystéine et leur implication dans des ponts disulfures.

Recherche de grands réarrangements génomiques

Un des éléments de notre travail a consisté à rechercher des grands remaniements génomiques chez les patients pour lesquels nous n'avions pas mis en évidence de mutations ou pour ceux pour lesquels nous n'avions mis en évidence qu'une seule mutation hétérozygote par la technique de Sanger. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III. Ils montrent que nous avons retrouvé deux grandes délétions à l'état hétérozygote pour les patients GT54 et GT68, ainsi qu'une duplication homozygote des exons 3 à 12 dans le gène *ITGA2B* pour le patient GT28. Malheureusement, pour ces trois

patients, nous n'avons pas pu vérifier la ségrégation familiale des mutations, l'ADN des apparentés n'étant pas accessibles.

4.3 CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

Malheureusement, dans notre étude, aucun groupe de mutations n'a pu être associé de façon évidente à un phénotype hémorragique particulier. En revanche, sur les 15 patients bénéficiant d'un génotypage complet et pour lesquels des anticorps anti- $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ avaient été identifiés, 11 (73%) présentaient des mutations tronquantes ou des mutations faux-sens interférant avec l'association des deux sous-unités, conduisant très probablement à leur dégradation rapide. Ces résultats rejoignent ceux que nous avons rapportés dans un article publié dans le journal *Haemophilia* en 2012 et qui faisait l'objet du second objectif de cette thèse. Nous en rapportons ici les principaux résultats et conclusions.

Dans notre laboratoire, entre 1991 et 2011, nous avons spécifiquement recherché la présence d'anticorps anti- $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ chez 24 patients atteints de TG. La majorité d'entre eux appartenaient à la communauté des Manouches (16/24 ; 67%), comme cela est souvent le cas en France. Ces patients sont porteurs d'une même mutation (c.1544+G>A) présente dans *ITGA2B* [18, 19]. Cette mutation est responsable d'un épissage cryptique entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré, empêchant l'expression du complexe $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$. Dans cette étude, nous avons montré que 81% des patients Manouches avaient développé des anticorps anti- $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$. Ce taux est extrêmement élevé si on le rapporte aux résultats des deux études précédemment publiées sur le sujet [77, 78], où la survenue de ces anticorps variaient entre 13% et 39%. Pour certains de nos patients Manouches, nous avons pu analyser le nombre de transfusions plaquettaires administrées

avant l'apparition de ces anticorps et, dans la majorité des cas, celui-ci était faible. Par exemple, pour deux patients Manouches, une seule transfusion plaquettaire avait été suffisante pour induire une réponse immunitaire, suggérant qu'il n'est pas nécessaire d'être fortement exposé aux concentrés de plaquettes pour développer des anticorps dirigés contre le complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$. De plus, un autre patient s'était immunisé seulement huit jours après avoir reçu des plaquettes, délai compatible avec l'apparition d'une réponse immunitaire naturelle. Tous ces résultats suggèrent que les patients Manouches sont fortement susceptibles de développer des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ en cas de transfusions plaquettaires. Cependant, bien que ces patients soient porteurs d'une même mutation, l'intensité et la persistance des anticorps au cours du temps pouvaient varier d'un patient à l'autre, suggérant que d'autres facteurs environnementaux (bactéries, virus) ou génétiques (complexes majeurs d'histocompatibilité, autres gènes) pourraient jouer un rôle important dans la constitution de cette réponse immunitaire.

En revanche, seulement deux des huit patients (25%) porteurs d'autres mutations avaient développé des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans notre série de cas, ce qui est comparable aux études précédemment décrites. Nous avons observé la formation de ces anticorps chez deux femmes présentant une maladie de type I. La première était porteuse d'une mutation faux-sens homozygote (P189S) dans *ITGB3* et avait été multi-transfusée. La seconde patiente était la seule à être porteuse de deux mutations non-sens et elle s'était fortement immunisée après avoir reçu uniquement un concentré plaquettaire 12 jours auparavant.

Ces résultats, bien qu'ils concernent un nombre limité de patients, montrent que les mutations tronquantes pourraient constituer un facteur de risque non négligeable de développer des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans la TG.



ORIGINAL ARTICLE

Natural history of platelet antibody formation against α IIb β 3 in a French cohort of Glanzmann thrombasthenia patients

M. FIORE,* N. FIRAHI,† X. PILLOIS,* P. NURDEN,* R. HEILIG‡ and A. T. NURDEN*

*Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP), Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Hôpital Xavier Arnozan, Pessac; †Hôpital des Enfants - Hôpital Pellegrin – CHU Bordeaux, Unité d'Hématologie Pédiatrique, Bordeaux; and ‡Genoscope, Centre National de Séquençage, 91000, Evry, France

Summary. Treatment of the bleeding syndrome in Glanzmann thrombasthenia (GT) is often complicated by naturally occurring isoantibodies directed against the α IIb β 3 integrin that cause the removal of or render ineffective transfused donor platelets. Such antibodies are produced after transfusion or pregnancy when the patient's immune system comes into contact with normal platelets. Despite many reports of anti- α IIb β 3 antibodies in GT patients, there is no consensus pertaining to their frequency, their long-term evolution in the circulation, or their formation in relation to either (i) the extent of the α IIb β 3 deficiency in the patient's platelets or (ii) the nature of the genetic defect (*ITGA2B* or *ITGB3* genes). Antibody screening was performed on a large series of 24

GT patients in South-West France dividing the patients into two cohorts: (i) 16 patients with the French gypsy mutation (c.1544 + 1G>A) within *ITGA2B* that gives platelets totally lacking α IIb β 3 and (ii) 8 patients carrying other defects of *ITGA2B* or *ITGB3* with different expression levels of α IIb β 3. Our results confirm that patients with premature termination mutations resulting in platelets lacking α IIb β 3 are the most susceptible to form isoantibodies, a finding that may be useful in deciding the choice of therapy between platelet transfusion and the use of recombinant factor VIIa (FVIIa).

Keywords: isoimmunization, platelet antibody, rFVIIa, thrombasthenia, α IIb β 3

Introduction

Glanzmann thrombasthenia (GT) is a rare autosomal recessive bleeding disorder caused by inherited defects of the genes encoding the platelet integrin, α IIb β 3 [1,2]. The disease is characterized by a lack of platelet aggregation in response to all physiological stimuli. GT has been classified into three subtypes, platelets of types I and II show quantitative abnormalities, with α IIb β 3 either absent or in trace amounts (<5%, type I) or at levels varying from 5% to 20% of those of normal donors (type II). Variant GT is given by qualitative abnormalities preventing function but allowing reduced or even normal surface expression of α IIb β 3 in platelets. Generally, in GT, bleeding is largely mucocutaneous in nature and if minor, local measures, sometimes in conjunction with anti-fibrinolytics, are sufficient; in contrast, platelet transfusions or recombinant factor VIIa are used to control or to prevent life-threatening blood loss [3–5].

Platelet transfusion therapy in GT can be followed by an immune response that is usually directed against the deficient α IIb β 3 (isoimmunization) and/or against MHC-Class I molecules (alloimmunization) [6–9]. Immune-mediated foetal thrombocytopenia can also occur in rare cases where a mother with GT bears a child whose platelets express α IIb β 3 [10,11]. The presence of anti- α IIb β 3 antibodies is a crucial problem for the management of GT patients [12,13]. However, it remains unclear how frequently they occur, whether they are persistent or indeed why the complication develops in some but not all transfused patients. Previous detailed characterizations of isoantibodies from GT patients show that they recognize epitopes located on α IIb β 3 or β 3 and that some can block platelet function as well as cause platelet elimination [14–16]. Although the epidemiology of neutralizing antibodies (inhibitors) is well known in patients with haemophilia A [17], it has been relatively poorly studied in GT. Little is known of the risk factors associated with antibody production although a direct relation between their formation and the type of GT has been suggested [18]. While the development of antibodies in GT patients is a result of transfusion therapy in most cases, the degree of exposure to platelet concentrates or red

Correspondence: Mathieu Fiore, CRPP, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Cardiologique, 33604 Pessac, France.
Tel.: +33 55 710 2850; fax: +33 55 710 2864;
e-mail: mathieu.fiore@chu-bordeaux.fr

Accepted after revision 13 December 2011

blood cell (RBC) transfusions has often not been clearly evaluated and the persistence of the antibodies over a long period poorly defined. Indeed, RBC concentrates occasionally contain the presence of residual platelets which can expose patients to a moderate risk of anti- α IIb β 3 development or anamnestic rise [19].

In France, GT is common within the Manouche tribe, one of the main branches of the French Gypsies [20,21]. The hypothesis of the existence of a founder mutation in this population was recently confirmed by us showing how a haplotype core across a 4 cM region was strongly associated with the originally described c.1544 + 1G>A French Gypsy mutation [20–22]. The clinical phenotype of the French Gypsy patients is the same as that for classic type I GT, with an absence of α IIb β 3 and a severe risk of bleeding. In South-West France, through the French Reference Centre for Platelet Disorders (CRPP), we have had the opportunity to follow many GT patients, including a majority of Manouche origin. We now report a retrospective study to assess immunization in 24 of these patients.

Materials and methods

Patients and sera studied

All GT patients satisfied diagnostic criteria for the disease by associating mucocutaneous bleeding, defects in α IIb β 3 expression or function and an absence of platelet aggregation to all agonists. A total of 24 GT patients (14 female patients, 10 male patients) belonging to 21 different families were examined. After genotyping, they were grouped into those possessing the Manouche gypsy mutation (16 patients, Table 1)

and those with other defects affecting the *ITGA2B* or *ITGB3* genes (eight patients, Table 2). All the 16 patients of Manouche origin showed an absence of α IIb β 3 expression by flow cytometry tested according to our standard procedures using antibodies directed against the platelet glycoprotein α IIb β 3 complex and each subunit [23]. Sera from the patients and control donors were prepared and decomplexed as described [24]. Samples were tested for platelet antibodies between 1991 and 2011. Our database was compiled from clinical records of patients, biological results obtained by the CRPP and transfusion records given by the French Blood Establishment Aquitaine-Limousin.

Data for patients included the following information when available: (i) age of the patient at first antibody screening; (ii) time after transfusion to antibody detection; (iii) subtype of GT and residual α IIb β 3 expression; (iv) mutation screening of the *ITGA2B* and *ITGB3* genes; (v) family history of GT and/or antibody formation; (vi) strong or weak antibody development; and (vii) evolution of the antibodies (persistent or transient).

Indirect MoAb-specific immobilization of platelet antigens

Monoclonal antibodies. The following murine monoclonal antibodies (MoAbs) were used: P2 (Immunotech, Marseille, France) directed against the human platelet α IIb β 3 complex; Y2/51 (Dako, Glostrup, Denmark) specific for β 3; and SZ22 (Immunotech) specific for α IIb [25–27].

MoAb-specific immobilization of platelet antigens. Blood from healthy donors of group O was drawn into

Table 1. Characteristics of the 16 GT Manouche patients screened for platelet antibody formation against α IIb β 3.

Patient	Age (years)	Gender	Platelet transfusions	Age at first antibody screening (years)	Platelet antibodies	Age of positivity (years)	Follow-up period (years)	MAIPA [‡]	Antibody persistence
M ₁	9	M	Yes	1	High	2	6	5	Yes
M ₂	4	F	Yes	2	High	2	–	1	–
M ₃	12	F	Yes	4	Low	10	7	3	No
M ₄	17	F	No	9	Neg	–	7	2	–
M ₅	9	M	Yes	3	High	3	–	15	Transient
M ₆	37	F	No	22	Neg	–	–	1	–
M ₇	44	M	UNK*	33	Low	33	–	1	–
M ₈	47	M	Yes	28	Neg	–	–	1	–
M ₉	69	F	Yes	57	High	57	–	1	–
M ₁₀	37	F	Yes	30	Low	33	3	4	–
M ₁₁	63	M	Yes	53	High	53	0.25 [†]	2	Yes
M ₁₂	39	F	Yes	29	High	29	3	4	Yes
M ₁₃	39	F	UNK	25	High	25	8	4	Yes
M ₁₄	10	F	Yes	8	High	8	–	1	–
M ₁₅	42	F	Yes	27	High	32	11	18	Transient
M ₁₆	52	M	Yes	37	Low	39	11	5	No

GT, Glanzmann thrombasthenia; MAIPA, MoAb-specific immobilization of platelet antigens.

*Unknown.

[†]Three months.

[‡]Number of times MAIPA tests were performed.

Table 2. Characteristics of the eight GT non-Manouche patients screened for platelet antibody formation against α Ib β 3.

Patient	Age (years)	Gender	Type	Expression levels of α Ib β 3 (%)	Gene	Molecular analysis	PLT*	Age at first antibody screening (years)	Platelet antibodies	Age of positivity (years)	MAIPA†	Follow-up period	Antibody persistence
GT1	60	M	I	<5	ITGB3	p-Tyr344Ser (Y318S [‡])	<10	60	No	-	1	-	-
GT2	76	M	I	<5	ITGB3	Splicing defect: c.1260G>A	1	66	No	-	1	-	-
GT3	82	M	II	8-10	ITGA2B	Splicing defect: c.2348+5G>C	>50	77	No	-	5	3y	-
GT4	72	F	II	10	ITGB3	p-Arg242stop (R216X)/p-Cys624Tyr (C598Y)	20-50	61	No	-	1	-	-
GT5	55	F	I	<5	ITGA2B	p-Glu355Lys (E324K)	>50	32	No	-	2	13y	-
GT6	82	M	Variant	40-55	ITGB3	p-Leu222Pro (L196P)/p-Cys624Tyr (C598Y)	<20	66	No	-	4	14y	-
GT7	57	F	I	<5	ITGB3	p-Pro89Ser (P163S)	20-50	38	High	38	6	16y	Yes
GT8	10	F	I	<5	ITGA2B	p-Gln228stop (Q197X)/p-Arg584Stop (R558X)	1	10	High	10	2	12d	-

GT, Glanzmann thrombasthenia; PLT, platelet transfusions; MAIPA, MoAb-specific immobilization of platelet antigens.

*Number of platelet concentrates transfused.

†Number of times MAIPA tests were performed.

‡Nomenclature without signal peptide.

acid-citrate-dextrose formula A [24]. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 150 g for 10 min and after sedimentation at 1200 g for 10 min, platelets were washed once before being resuspended at 2×10^9 platelets mL^{-1} in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with bovine serum albumin (BSA) [24]. Volumes (20 μL) of the platelet suspension were sensitized for 1 h with 300 μL serum from patients or control donors and the platelets washed. After resuspension, each of the selected platelet glycoprotein-specific MoAbs (see above), diluted to a predefined optimal concentration, were added separately in a final volume of 20 μL . The mixture was incubated for 1 h at room temperature. The platelets were then washed once and solubilized in 80 μL of a lysis solution composed of 0.5% Nonidet P-40 by incubating overnight at 4°C. In parallel, microtitre plates were coated with a goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and incubated overnight at 4°C [24]. After four washes, 200 μL of milk PBS-Tween buffer (blocking buffer) was added to each well and incubated for 1 h, then washed four times. A quantity of 70 μL of the supernatant from lysed platelets was diluted in 200 μL of milk PBS-Tween buffer. A quantity of 105 μL of the respective diluted supernatants was added in duplicate to each coated well. The plates were incubated for 90 min at 4°C and washed four times. A volume (100 μL) of alkaline phosphatase-labelled goat anti-human IgG/M F(ab'2) (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:2000 in milk PBS-Tween buffer was added to each well. After incubation for 1 h at 4°C, the tray was washed four times and 200 μL substrate (paranitrophenylphosphate in diethanolamine buffer) was added as described [24]. After 60 min in the dark, absorbance was measured at 405 nm in a TECAN microplate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland).

Expression of results. All results for the patients are calculated as a ratio of their optical density (OD) compared to that of the mean value of a series of 39 control sera. For results to be considered positive, this ratio must exceed by three standard deviations (SD) the mean of these controls [24]. Positive results were classified as follows: weakly positive when the patient ratio was up to twofold increased compared to threshold and highly positive when the ratio was greater than a twofold increase. As an additional internal control, a day-to-day serum from a normal donor was tested in parallel with those from the patients.

Evaluating the inhibition of platelet aggregation by serum antibody

The capacity of patient's platelet-poor plasma (PPP) to inhibit the aggregation of normal platelets was also assessed on occasion. PPP was prepared from citrated blood centrifuged for 15 min at 2000 g. Control PRP at

a concentration of 200 000 platelets μL^{-1} was incubated for periods of up to 15 min with 200 μL of patient's or control PPP tested in parallel [28]. Aggregation was initiated with 5.0 μM ADP in a PAP4 aggregometer (Bio/Data Corp., Wellcome Lab., Paris, France) according to standard procedures.

Results

The majority of the GT patients screened by us were of Manouche origin (16 out of 24 patients). Due to this recruitment bias, two groups were analysed separately, those with the French Gypsy mutation and those with other defects of *ITGA2B* or *ITGB3*.

French Gypsy mutation and the development of platelet antibodies

All the Manouche patients were homozygous for the IVS15(+1)G>A mutation in *ITGA2B* and failed to express $\alpha\text{IIb}\beta 3$ on the surface of their platelets.

Of these patients, 12 had documented evidence of platelet transfusions associated with or without red blood cell concentrates (Table 1; the transfusion history of two patients was unavailable to us). A total of 13 of the 16 patients developed platelet antibodies. An antibody response was not detected in only 1 of the 12 patients who received a platelet transfusion (M_8). Two patients had never received treatment with platelet concentrates and neither of them had developed platelet antibodies (M_4 and M_6). One of these had been treated with activated recombinant factor VII alone.

Of the 13 patients with antibodies, nine had at least one positive MoAb-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) assay with a ratio above a twofold increase (high responders) and the other four had a ratio up to twofold increase compared to threshold (low responders). Ten of these patients have been followed for periods ranging between 3 months and 11 years. For two patients, antibodies disappeared (patients M_3 and M_{16}) and for two other patients, antibodies were transient as they were not detected on all occasions (M_5 and M_{15}) (Table 1 and Fig. 1). For four patients, evidence was obtained that the antibodies were persistent. Incubating control PRP with PPP from two patients (M_7 and M_{15}) for intervals up to 15 min failed to result in inhibition of platelet aggregation with ADP (data not shown). M_7 and M_{15} were respectively low and high responders at the time of assays.

The relationship between the number and frequency of transfusion with platelet concentrates (with or without concomitant administration of RBC concentrates) and the natural history of antibody expression could be assessed for six of the patients (Fig. 1). Of these, four patients had received no more than five

platelet concentrates prior to the development of antibodies (patients M_1 , M_3 , M_5 and M_{12}) and the two others were exposed to less than 10 platelet concentrates (M_{10} and M_{15}). The time between the last platelet transfusion and antibody screening showed that platelet antibodies against $\alpha\text{IIb}\beta 3$ were still present after 2–6 years for four of these patients (M_1 , M_5 , M_{12} and M_{15}). One patient developed isoantibodies against $\alpha\text{IIb}\beta 3$ after less than 10 days following platelet replacement (M_{15}). Platelet transfusions, in association with rFVIIa were continued in two of high responders (M_5 and M_{12}) because rFVIIa alone was not sufficient to support life-threatening bleeding.

In this Manouche population, only one pregnancy has been monitored for platelet isoantibody formation. This woman (M_{10}) had not developed antibodies directly attributable to pregnancy, but to platelet transfusions during a caesarean delivery. Indeed, she tested negatively 1 week before her delivery.

In three Manouche families, more than one member was screened for platelet antibodies. Two children of the first family tested were highly positive for serum antibodies to $\alpha\text{IIb}\beta 3$ despite having only received one and four platelet concentrates, respectively patients M_1 and M_2 (Table 1). Their antibodies were detected when they were both 2 years old. In the second family (M_3 and M_4), only one of the two members had been previously transfused and possessed weakly positive antibodies (M_3). M_3 had received only one platelet concentrate. In the third family, both members were highly positive, with one member (M_{15}) having received less than ten platelet concentrates in his life, although no transfusion history was available to us for the other one (M_{13}).

Development of platelet antibodies in other GT cases

Eight other patients (four men and four women) were investigated for platelet antibodies (Table 2). Of these, five had type I disease with little or no surface expression of $\alpha\text{IIb}\beta 3$, two had type II and one had a variant form. Genotyping revealed that three patients had causative mutations in *ITGA2B* whereas five others possessed mutations in *ITGB3*. All the patients had received treatment with platelet concentrates; RBC concentrates were also given in the event of severe anaemia).

In contrast to the Manouche cohort, only two patients had developed detectable platelet antibodies (GT7 and GT8) (Table 2). These isoantibodies occurred in patients with type I disease and they were both high responders. GT7 has a homozygous missense mutation in the *ITGA2B* gene and she had been highly exposed to platelet concentrates. She has been followed by us for 16 years and antibodies have persisted; she has been tested six times (GT7; Fig. 2). Incubation of a control PRP with her PPP, taken in September 1996, resulted in

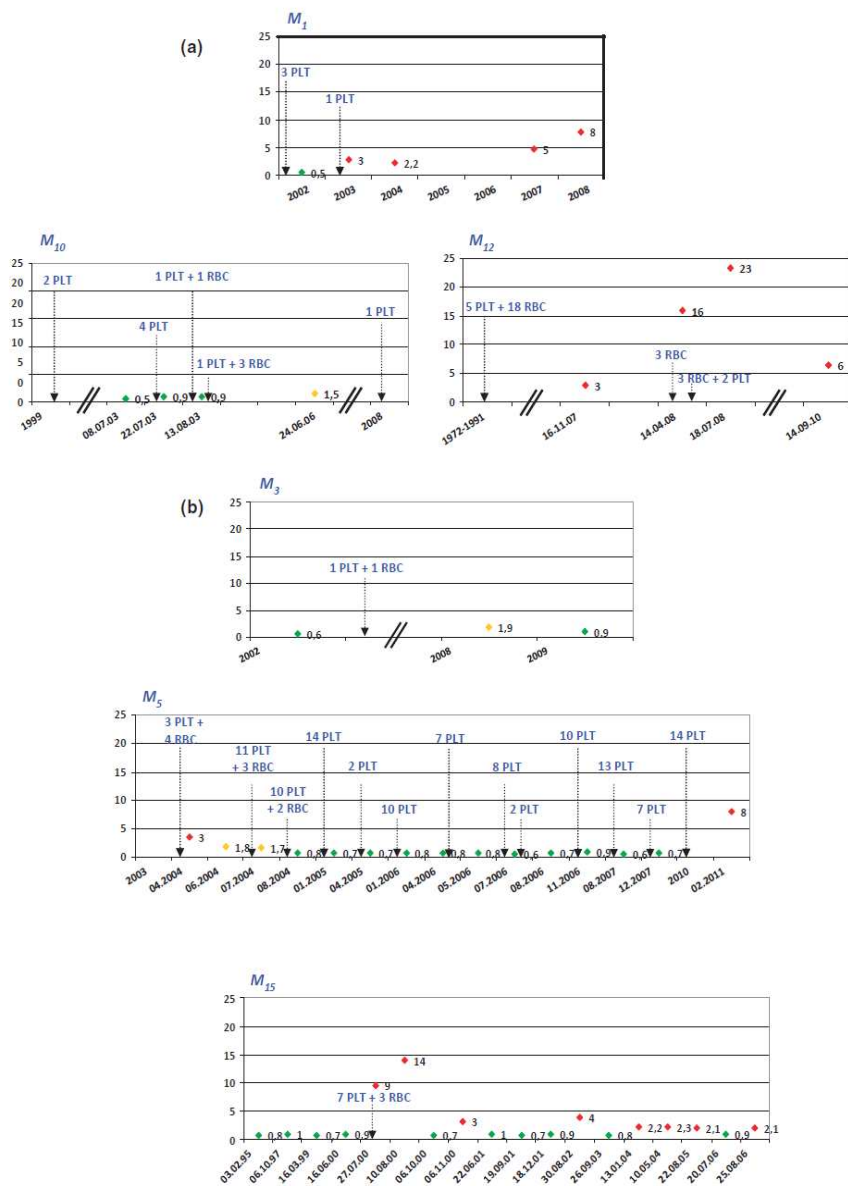


Fig. 1. Observations on the development of anti- α IIb β 3 antibodies in six Manouche GT patients. Subjects could be divided in two categories. (a) In two subjects, antibodies persisted and were repeatedly documented after their initial detection. In one case, we could not prove the disappearance of the antibody as it was not tested after its initial detection (M_{10}). (b) In three subjects, antibodies were not documented on all occasions when tested during follow-up visits. They were sometimes transiently undetectable, despite repeated platelet transfusions in one case. It should also be noted that in both groups, the antibody titre was variable over time. Values correspond to ratios for antibodies detected with the P2 MoAb to α IIb β 3 (See Methods). The level of positivity was given as follows: weakly positive when the patient ratio was up to twofold greater than the threshold (orange) and highly positive when the ratio was above a twofold increase (red). Negative results are represented in green. PLT, platelet transfusions; RBC, administration of red blood cells concentrates.

a significant inhibition of platelet aggregation to ADP (Fig. 3), confirming the potential of such antibodies to block platelet function. GT8 tested positively for isoantibodies against α IIb β 3 less than 12 days following her first and only platelet transfusion. She is heterozy-

gous for two nonsense mutations in the *ITGA2B* gene. Surprisingly, although she has been multi-transfused (>50 platelet concentrates), a type I GT patient (GT5) with a homozygous mutation in *ITGA2B* has never developed platelet antibodies against α IIb β 3.

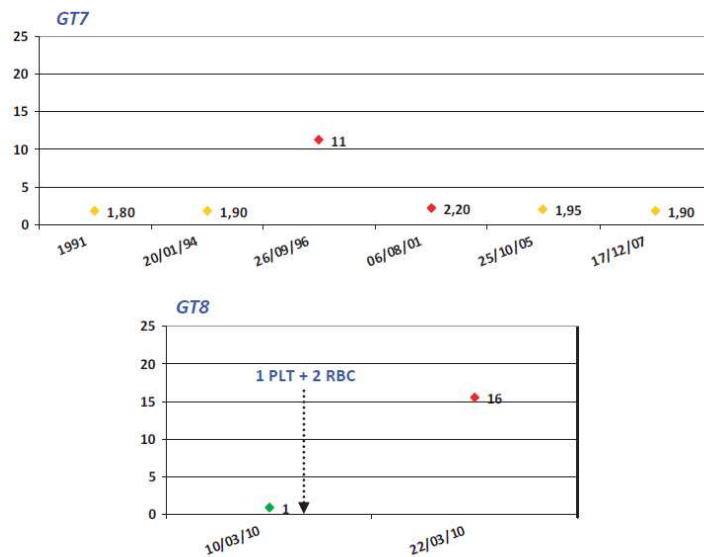


Fig. 2. Features of two GT patients without the French Gypsy mutation who developed platelet antibodies against α IIb β 3. These two patients developed high titre antibodies with two different patterns. GT7 received platelet transfusions on several occasions although the chronology remains somewhat uncertain and does not appear on the graph. Low titre antibodies were detectable on two early occasions, then she gave a high titre response after which her level of antibodies fell although persisting over 5 years. GT8 developed high-titre antibodies although she just received one platelet concentrate. Antibodies were present after only 12 days following exposure.

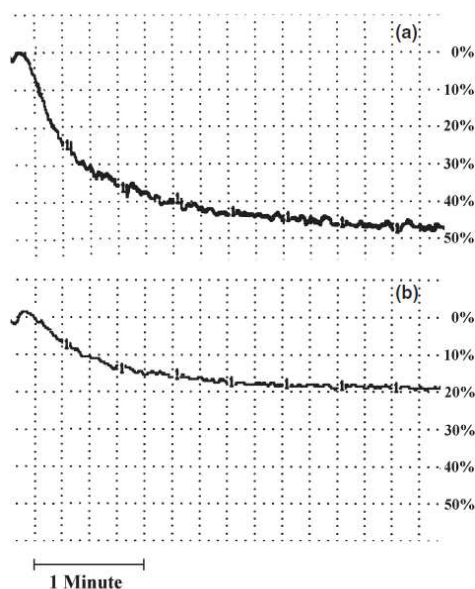


Fig. 3. Detection of an antibody able to inhibit platelet aggregation. Plasma taken in 1996 (200 μ L) from the patient (GT7) inhibited platelet aggregation with ADP (5 μ M) when added to PRP (300 μ L) from a control donor. (a) Control PRP and control PPP; (b) Control PRP and patient's PPP.

In our non-Manouche population, two pregnant women were monitored for platelet isoantibodies after their pregnancies (GT4: type II and GT5: type I), but neither of them tested positively. Nevertheless, both of them were highly transfused with platelet concentrates during their life yet neither has developed platelet antibodies against α IIb β 3.

Discussion

Glanzmann thrombasthenia is a rare and severe haemorrhagic disorder. All of the 24 GT patients in our study have experienced at least one bleeding event and almost all of them (20/22; the transfusion history of two patients was unavailable to us) have received platelet transfusions. Initial studies of platelet antibody formation against α IIb β 3 in GT were largely performed on isolated cases and mainly concerned antibody characterization [7,9,12,13,29]. However, Poon *et al.* in 2004 reported on the status of platelet antibodies in 54 non-genotyped patients [5]. Sixteen (30%) were positive against α IIb β 3, eight for anti-HLA (15%) and five for both (9%). More recently, Santoro *et al.* investigated 17 genotyped Italian GT patients for the presence of anti-HLA and anti-integrin α IIb β 3 antibodies [6]. Of these patients, antiplatelet antibodies were present in 4/16 transfused patients (25%); two patients had antibodies to HLA, one patient possessed antibodies to α IIb β 3 and one patient had antibodies to both.

We have specifically looked for antibodies reactive with the α IIb β 3 integrin in 24 GT patients who were screened by the MAIPA assay between 1991 and 2011. The majority of French GT patients belong to the Manouche gypsy tribe, which is also the case in our study (67%). They carry a founder disease-causing mutation, the c.1544 + 1G>A substitution at the splice donor site of intron 15 of the *ITGA2B* gene [20,21]. This mutation causes intron 15 to be spliced at an alternative cryptic donor site, which produces a frame shift and a premature TGA stop codon. The result is platelets totally lacking α IIb β 3 integrin. We now show that 81% (13/16) of the Manouche GT patients under

study had developed platelet antibodies against α IIb β 3. This is a very high percentage with respect to the previous reports discussed above [5,6]. For some of these patients, we could analyse the number of platelet transfusions before the development of the antibodies and, in most cases, the number was low. For M₂ and M₃, just a single platelet transfusion was sufficient to induce an immune response, which means that it is not necessary to be highly exposed to normal platelets to develop isoantibodies against α IIb β 3. Furthermore, M₁₅ was immunized 8 days after having received platelet concentrates, a period compatible with a new immune response (Fig. 2) and, in other cases, antibodies persisted for years, possibly for life (Table 1). All these results suggest that Manouche GT patients are highly susceptible to produce antibodies against α IIb β 3, which is missing from their own platelets. However, although the Manouche patients carry the same founder mutation, the strength and persistence of antibodies over time varied between individuals, suggesting that other environmental (e.g. bacterial or viral infections) or genetic factors (e.g. major histocompatibility complex genes, other gene polymorphisms) play key roles in the selection of antibody repertoires.

In contrast, only 25% (2/8) of the patients with GT as a result of genetic mutations in other regions of the *ITGA2B* or *ITGB3* genes developed antibodies in our cohort. This frequency is in line with previously published studies [5,6]. Antibody formation was observed in two female type I GT patients; GT7 having a novel homozygous β 3Pro189Ser substitution (P163S without signal peptide) while GT8 was compound heterozygous for two nonsense mutations in *ITGA2B* (Table 2). GT8 was positive in MAIPA after having received just a single platelet concentrate 12 days earlier. From a review of the literature, Kashiwagi *et al.* reported that all but one of seven mutations known to be associated with anti- α IIb β 3 antibodies in GT patients were homozygote or compound heterozygote for premature termination mutations, a finding that we have also reported for a single but well studied patient [30]. The exception described by Kashiwagi *et al.* [30] was a patient homozygote for a missense substitution who produced anti- α IIb β 3 antibodies after massive platelet transfusions. Here, in our study, GT7, who carried a different homozygous missense mutation, had also been highly exposed to platelet concentrates prior to antibody detection. So, our results are concordant with previously reported cases, and confirm that premature termination mutations are a high risk for platelet antibody formation against α IIb β 3.

Although she had been exposed to multiple platelet concentrates on several occasions, GT5, a patient with type I GT, has never developed antibodies to α IIb β 3. The molecular defect of this patient is a homozygous single base pair substitution in exon 12 of *ITGA2B*,

leading to a Glu355Lys (E324K) [31]. It has been previously shown that this mutation, repeated in several unrelated GT patients, does not impair complex formation but influences the maturation of the complex and therefore cell surface expression [31]. The complex, in an immature maturation state, was present in her platelets, a situation that perhaps has protected her from isoantibody development. Thus, not every patient with type I GT and severely deficient in α IIb β 3 will develop platelet antibodies in their life, even if they are multi-transfused. All of them are not equal in terms of immunization potential. Likewise, patients with type II or variant GT are unlikely to develop antibodies in view of the residual integrin expression. In our study, neither of the two patients with type II disease or the patient with a variant form was immunized against α IIb β 3 despite the fact that all of them had received many transfusions.

Infancy or childhood is generally accepted to be an important risk factor for inhibitor development in haemophilia [32–35]. However, the potential cause of a higher inhibitor risk when therapy is started in early life is still not totally understood. Our study shows that the five GT patients less than or equal to 10 years of age with no expression of α IIb β 3 had all developed high levels of antibody. Although furthermore studies are required to confirm the importance of age for antibody development in GT patients, these results suggest that starting transfusion therapy in early life might increase the risk of antibody formation, and, if so, it should be taken into account by the physicians.

Management of pregnancy in women with GT is also a real challenge [29]. One of the major complications relates to foetal immune thrombocytopenia induced by the transplacental passage of the maternal IgG anti- α IIb β 3 isoantibodies. The risk of isoantibody development when foetal platelets, carrying the α IIb β 3 glycoprotein, become exposed to the mother's immune system is real and can lead to severe haemorrhage and foetal loss [29]. In our cohort, we have tested, after their pregnancies, three different women (GT4, GT5 and M₁₀), but we could not demonstrate any maternal isoimmunization in these cases. In fact, GT4 was a type II GT and GT5, as we demonstrated above, has always tested negatively although she has often been transfused. Moreover, M₁₀ also tested negatively 1 week before her delivery. To date, the incidence of this complication is poorly evaluated. Nevertheless, Siddiq *et al.* recently analysed 40 different case reports of pregnancies in GT and showed that antibodies (with specificity against α IIb β 3 and/or HLA system epitopes) were identified in 16/22 (73%) documented pregnancies and that these antibodies were associated with four neonatal deaths [11]. Nevertheless, these deaths may also result from the mother having pre-existing antibodies due to platelet transfusion prior to pregnancy (see table I, ref. [11]).

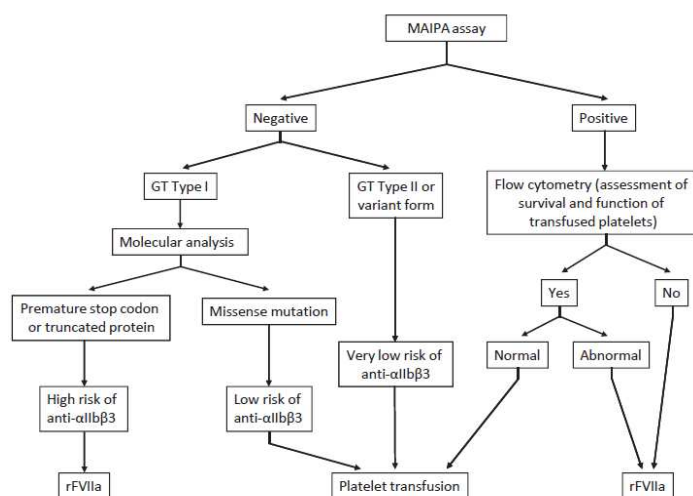


Fig. 4. Platelet antibody formation against α IIb β 3 in GT: risk assessment and proposals for management.

Another situation that remains unclear is the capacity of the antibodies to inhibit platelet function by blocking reactive sites on α IIb β 3. Early studies showed a strong inhibitory capacity for two antibodies both reacting with complex-dependent determinants on α IIb β 3 [16]. Here, we were only able to prove a blocking capacity for antibodies from one of the three patients tested. Again, more studies are needed; for example, it is not known whether antibody specificities vary from patient to patient or whether the inhibitory capacity is more a question of antibody titre (or indeed both). This underlines the importance of collaborating with other

other mutations preventing α IIb β 3 biosynthesis in their megakaryocytes. For those type I patients, known to possess antibodies, the survival of transfused control platelets can be easily followed by flow cytometry [37]. This is important as the presence of anti- α IIb β 3 antibodies does not always lead to an immediate platelet removal, a finding perhaps linked to the antibody isotype. Flow cytometric analysis can also show whether transfused platelets retain normal reactivity or not to ADP stimulation, by assessing their function using PAC-1 binding or fluorochrome-labelled fibrinogen [37].

groups to build large cohorts of GT subjects for such studies [36].

Conclusion

To conclude, understanding the genetic and environmental risk factors for platelet antibody development is essential to tailor the treatment to each patient on an individual basis. Recombinant FVIIa (Novoseven, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) was approved in France in 2004 but only for treatment of GT in patients with iso and/or alloantibodies and a history of refractoriness to platelet transfusion.

Based on our results, we can propose a risk assessment algorithm and proposals for management of platelet antibody formation against α IIb β 3 in GT (Fig. 4). Although platelet transfusions remain the choice for stopping severe haemorrhage in type II and variant patients, in type I patients, where bleeding is severe, activated recombinant factor VII appears to represent a good alternative therapeutic option [5]. This is particularly so for type I patients with nonsense or

Finally, identification of additional genetic factors, a well studied phenomenon in haemophilic patients with inhibitors [38], will help to determine the impact of these antibodies on platelet transfusion efficacy.

Acknowledgements

We thank Drs N Aladjidi, J-J Choulot, S Clayssens, V Doireau, M Micheau, C Mouton and P Sié for kindly providing clinical records, sera and DNA samples from GT families; this study was financed by INSERM (ANR-08-GENO-028-03) and from a subvention accorded to Alan T Nurden by GtS-Maladies Rares.

Author contributions

MF and NF collected and analysed data; ATN and PN supervised the research project; RH and XP performed genetic analysis; MF and ATN wrote the article.

Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

References

- Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 10.
- Nurden AT, Fiore M, Nurden P, Pillois X. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood* 2011; 118: 5928–37.
- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW *et al.* A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135: 603–33.
- Di Minno G, Coppola A, Di Minno MN, Poon MC. Glanzmann's thrombasthenia (defective platelet integrin α IIb β 3): proposals for management between evidence and open issues. *Thromb Haemost* 2009; 102: 1157–64.
- Poon MC, D'Oiron R, Von Depka M *et al.* Prophylactic and therapeutic recombinant factor VIIa administration to patients with Glanzmann's thrombasthenia: results of an international survey. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1096–103.
- Santoro C, Rago A, Biondo F *et al.* Prevalence of allo-immunization anti-HLA and anti-integrin α IIb β 3 in Glanzmann Thrombasthenia patients. *Haemophilia* 2010; 16: 805–12.
- Martin I, Kriaa F, Proulle V *et al.* Protein A Sepharose immunoadsorption can restore the efficacy of platelet concentrates in patients with Glanzmann's thrombasthenia and anti-glycoprotein IIb-IIIa antibodies. *Br J Haematol* 2002; 119: 991–7.
- Flood VH, Johnson FL, Boshkov IK *et al.* Sustained engraftment post bone marrow transplant despite anti-platelet antibodies in Glanzmann thrombasthenia. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 971–5.
- Taaning E, Knudsen FU, Thorsen S, Jonsson V. Immunization against platelet glycoprotein IIb-IIIa in Glanzmann's thrombasthenia. *Eur J Haematol* 1997; 58: 360–1.
- Kaplan C. Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 39.
- Siddiq S, Clark A, Mumford A. A systematic review of the management and outcomes of pregnancy in Glanzmann thrombasthenia. *Haemophilia* 2011; 17: e858–69.
- Bellucci S, Damaj G, Boval B *et al.* Bone marrow transplantation in severe Glanzmann's thrombasthenia with antiplatelet alloimmunization. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 327–30.
- Conte R, Cirillo D, Ricci F, Tassi C, Tazzari PL. Platelet transfusion in a patient affected by Glanzmann's thrombasthenia with antibodies against GPIIb-IIIa. *Haematologica* 1997; 82: 73–4.
- Levy-Toledano S, Tobelem G, Legrand C *et al.* Acquired IgG antibody occurring in a thrombasthenic patient: its effect on human platelet function. *Blood* 1978; 51: 1065–71.
- Gruel Y, Brojer E, Nugent DJ, Kunicki TJ. Further characterization of the thrombasthenia-related idiotype OG. Antiidiotype defines a novel epitope(s) shared by fibrinogen B beta chain, vitronectin, and von Willebrand factor and required for binding to beta 3. *J Exp Med* 1994; 180: 2259–67.
- Jallu V, Diaz-Ricart M, Ordinas A, Pico M, Vezon G, Nurden AT. Two human antibodies reacting with different epitopes on integrin beta 3 of platelets and endothelial cells. *Eur J Biochem* 1994; 222: 743–51.
- Hay CR, Palmer B, Chalmers E *et al.* Incidence of factor VIII inhibitors throughout life in severe hemophilia A in the United Kingdom. *Blood* 2011; 117: 6367–70.
- Nurden AT, Kunicki T, Nurden P *et al.* Mutation analysis for a patient with Glanzmann thrombasthenia who produced a landmark isoantibody to the α IIb β 3 integrin. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1866–8.
- Bierling P, Fromont P, Elbez A, Duedari N, Kieffer N. Early immunization against platelet glycoprotein IIIa in a newborn Glanzmann type I patient. *Vox Sang* 1988; 55: 109–13.
- Schlegel N, Gayet O, Morel-Kopp MC *et al.* The molecular genetic basis of Glanzmann's thrombasthenia in a gypsy population in France: identification of a new mutation on the α IIb gene. *Blood* 1995; 86: 977–82.
- de la Salle C, Schwartz A, Baas MJ, Lanza F, Cazenave JP. Detection by PCR and HphI restriction analysis of a splice site mutation at the 5' end of intron 15 of the platelet GPIIb (α IIb integrin) gene responsible for Glanzmann's thrombasthenia type I in Gypsies originating from the Strasbourg area. *Thromb Haemost* 1995; 74: 990–1.
- Fiore M, Pillois X, Nurden P, Nurden AT, Austerlitz F. Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 981–7.
- Fiore M, Nurden AT, Vinciguerra C, Nurden P, Pillois X. Rapid diagnosis of the French gypsy mutation in Glanzmann thrombasthenia using high-resolution melting analysis. *Thromb Haemost* 2010; 104: 1076–7.
- Clofent-Sanchez G, Lucas S, Laroche-Traineau J *et al.* Autoantibodies and anti-mouse antibodies in thrombocytopenic patients as assessed by different MAIPA assays. *Br J Haematol* 1996; 95: 153–60.
- Chong BH, Du XP, Berndt MC, Horn S, Chesterman CN. Characterization of the binding domains on platelet glycoproteins Ib-IX and IIb/IIIa complexes for the quinidine-dependent antibodies. *Blood* 1991; 77: 2190–9.
- Basch RS, Kouri YH, Karparkin S. Expression of CD4 by human megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8085–9.
- Thiele J, von Ammers E, Wagner S, Degel C, Fisher R. Megakaryocytopoiesis in idiopathic thrombocytopenic purpura: a morphometric and immunohistochemical study on bone marrow biopsies with special emphasis on precursor cells. *Hematol Pathol* 1991; 5: 75–82.
- Nurden P, Poujol C, Winckler J *et al.* Immunolocalization of P2Y1 and TP α receptors in platelets showed a major pool associated with the membranes of α -granules and the open canalicular system. *Blood* 2003; 101: 1400–8.
- Leticie N, Kaplan C, Lemery D. Pregnancy in mother with Glanzmann's thrombasthenia and isoantibody against GPIIb-IIIa: Is there a foetal risk? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 121: 139–42.
- Kashiwagi H, Kiyomizu K, Kamae T *et al.* Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti- α IIb β 3 alloantibodies. *Int J Hematol* 2011; 93: 106–11.
- Milet-Marsal S, Breillat C, Peyruchaud O *et al.* Analysis of the amino acid requirement for a normal α IIb β 3 maturation at α IIbGlu324 commonly mutated in Glanzmann thrombasthenia. *Thromb Haemost* 2002; 88: 655–62.
- Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I *et al.* Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992; 339: 594–8.
- Kavali K, Gringeri A, Bader R, Nisli G, Polat A, Aydinok Y. Inhibitor development and substitution therapy in a developing country: Turkey. *Haemophilia* 1998; 4: 104–8.
- Scharrer I, Neutzling O, Schwaab R, Oldenburg J, Ehrlich H. Experiences with recombinant factor VIII products: development of inhibitors and immune tolerance therapy. *Ann Hematol* 1998; 76(Suppl. 1): A1–6.
- Lorenzo JL, Lopez A, Altisent C, Aznar JA. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *Br J Haematol* 2001; 113: 600–3.
- Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia: the need for epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1875–7.
- Nurden A, Combrie R, Nurden P. Detection of transfused platelets in a patient with Glanzmann thrombasthenia. *Thromb Haemost* 2002; 87: 543–4.
- Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12(Suppl. 6): 15–22.

5 DISCUSSION

La thrombasthénie de Glanzmann est la plus fréquente des thrombopathies constitutionnelles. C'est une maladie hémorragique sévère et dans la majorité des cas, les symptômes sont présents dès la naissance. La plupart des patients inclus dans notre série internationale présentaient les critères diagnostiques classiques de la TG. Quelques rares cas de patients avaient une expression résiduelle du complexe et des profils d'agrégation plaquettaire très perturbés, permettant leur classification dans les formes variantes de la maladie. Cinquante huit familles (76%), sur les 76 incluses, présentaient une forme de type I de la maladie, dix familles (12%) présentaient une forme de type II et sept familles (10%) présentaient une forme variante; une famille n'ayant pas pu être caractérisée. Le séquençage des deux gènes par la technique de Sanger a pu fournir un diagnostic génotypique complet pour 57 familles (75%). Les patients pour lesquels une seule ou aucune mutation n'avait été retrouvée ont été étudiés dans un second temps par la recherche de grands réarrangements génomiques. Celle-ci a permis d'étendre le diagnostic génotypique pour trois autres patients et c'est donc 60 patients (79%) au total qui ont pu bénéficier d'un diagnostic génétique complet. Cependant, dans cette maladie, la mise en évidence de grands réarrangements génomiques reste un phénomène isolé et quelques rares cas ont été décrits auparavant [89-92]. Cette grande étude internationale a été l'occasion de mettre en place cette technique dans le centre de Lyon où nous la réalisons encore maintenant pour des patients chez lesquels le séquençage classique n'a pas permis d'aller au bout du diagnostic génétique.

Après étude des grands réarrangements, 16 familles n'ont pas pu obtenir de diagnostic génétique définitif, soit parce qu'une seule mutation avait été retrouvée (cinq patients), soit parce qu'aucune mutation n'avait été mise en évidence (11 patients). Pour expliquer ces résultats, les hypothèses que nous retenons sont les suivantes : (i) les

variations génétiques responsables se situaient dans des régions non séquencées, comme des régions introniques profondes ou des régions régulatrices des gènes ; ou (ii) le gène responsable de la maladie n'était ni *ITGA2B*, ni *ITGB3*. Cette dernière hypothèse a pu être observée pour deux patients (GT2 et GT4), qui présentaient une forme variante de la maladie et pour lesquels une seule mutation (GT4), voire aucune (GT2), n'avait été identifiée. Ces patients ont fait l'objet d'investigations supplémentaires réalisées par l'équipe du Pr MC Alessi à Marseille. Le premier malade (GT4) était un patient issu de la communauté des Manouches pour lequel, nous avons effectivement retrouvé la mutation gitane, mais uniquement à l'état hétérozygote. Cette mutation isolée ne pouvait donc pas à elle seule expliquer le phénotype plaquettaire du patient. D'autre part, il présentait de façon associée un déficit immunitaire qui restait inexpliqué. Cette association phénotypique (thrombopathie et déficit immunitaire) se rencontre dans une forme particulière de maladie plaquettaire qui touche la kindlin-3, une protéine qui interagit avec le complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$, nécessaire à sa fonction de signalisation plaquettaire, mais aussi avec des intégrines leucocytaires. Très rapidement, cette hypothèse a été vérifiée et confirmée par la mise en évidence de l'absence de cette protéine dans les plaquettes du patient, rendant ainsi le complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ non fonctionnel malgré son expression résiduelle à la surface plaquettaire [50]. L'étude du gène *FERMT3*, qui code pour cette protéine, a permis de mettre en évidence une mutation homozygote du site accepteur d'épissage de l'exon 3, conduisant à une anomalie de l'épissage, un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Concernant le second patient (GT2), pour lequel aucune mutation n'avait été mise en évidence, un séquençage d'exomes de différents membres de la famille a été entrepris. Ceci a permis de mettre en évidence une mutation faux-sens à l'état homozygote (Gly248Trp) dans le gène *RASGRP2*, qui code pour la protéine CALDAG-GEFI, une protéine d'échange de nucléotide guanilyque activant la protéine Rap1, elle-même

nécessaire à l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [93]. Au total, ces deux travaux ont permis de confirmer que des défauts d'activation du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Inside-Out signaling) peuvent être responsables de phénotypes très similaires à ceux de la TG et devant des formes variantes de la maladie, si aucune mutation n'est identifiée dans les gènes *ITGA2B* et *ITGB3*, il faut envisager d'étudier des gènes impliqués dans la fonction de l'intégrine.

Concernant le spectre mutationnel des gènes *ITGA2B* et *ITGB3*, nous avons pu observer que les mutations ponctuelles se répartissaient globalement de la manière suivante: la moitié des mutations étaient des mutations faux-sens et l'autre moitié, répartie de manière égale, était des mutations tronquantes ou des mutations affectant l'épissage. Parmi les mutations affectant l'épissage, nous avons pu constater que la délétion intronique c.1440-13_c.1440-1 était une mutation récurrente. En effet, nous l'avons observé chez sept familles provenant de trois pays européens différents (GT21, GT49, GT64, GT67 et GT74, France; GT10, Italie; GT36, Espagne). Notamment, pour la famille d'origine espagnole, cette mutation a été détectée chez tous les membres atteints (GT36a, GT36b et GT36c), suggérant fortement son association à la maladie. D'autre part, dans notre étude, nous avons montré par minigène que cette délétion était bien délétère. Bien que la nomenclature associée à cette mutation était légèrement différente de la nôtre, cette délétion est très certainement celle déjà rapportée par Jallu et al. [86] chez des patients du Nord-Ouest de la France, confirmant la récurrence de cette mutation au sein des patients Glanzmann. L'hypothèse d'une mutation fondatrice reste peu probable, devant la présence de celle-ci chez des patients d'origine très différente. Cependant, il serait intéressant de le vérifier, en étudiant notamment les polymorphismes associés à celle-ci, présents en amont et en aval sur le même chromosome 17, à la recherche d'un haplotype commun. En effet, nous l'avons déjà fait pour démontrer que la mutation gitane, retrouvée chez différentes familles

Manouches, provenait bien d'un ancêtre commun, dont nous avons pu dater l'origine au XVII-XVIII^{ème} siècle [5].

L'analyse attentive des mutations identifiées dans ce travail a permis de confirmer que des mutations exoniques survenant à proximité de jonction exon-intron étaient une cause possible d'altération de l'épissage dans la TG. C'était le cas pour trois mutations, dont deux variations avaient déjà été rapportées et étudiées auparavant. La variation c.1878G>C située dans l'exon 18 d'*ITGA2B* entraînait un saut de l'exon 18 et la variation c.1260G>A située dans l'exon 9 d'*ITGB3* provoquait un saut de l'exon 9 [86, 87]. La variation c.571T>G, nouvellement identifiée et présente dans l'exon 4 d'*ITGA2B*, code pour un remplacement d'acide aminé de la phénylalanine à la position 191 par une valine. Les logiciels de prédiction faisaient de cette substitution d'acides aminés, une variation non pathogène, ce qui nous a amené à nous interroger sur le mécanisme physiopathologique de cette variation, située par ailleurs à proximité d'une jonction intron-exon. Les logiciels de prédiction d'épissage montraient effectivement, l'utilisation possible d'un site cryptique à cette position, ce que nous avons finalement confirmé par minigène. Bien que ce résultat montre, comme les mutations précédemment rapportées, que des mutations exoniques peuvent avoir un impact sur l'épissage, le mécanisme mis en jeu était légèrement différent dans la mesure où dans notre cas, il n'y avait pas de saut d'exon, mais utilisation d'un site cryptique situé 4 pb en amont.

À l'exception des groupes ethniques, notre étude confirme que la majorité des familles présentaient des mutations qui leur étaient propres. Ce travail nous a donc permis d'identifier 57 nouvelles variations génétiques associées à cette maladie, étendant ainsi son spectre mutationnel. Parmi elles, notre intérêt s'est particulièrement focalisé sur les mutations faux-sens. La majorité d'entre-elles (54%) survenait dans le domaine β -propeller d' α_{IIb} ou le domaine β -I de β_3 , alors que ces deux régions protéiques constituent moins de la

moitié des acides aminés du complexe. Ce n'est pas surprenant quand on sait que ces deux domaines ultra-conservés constituent l'interface principale entre les deux sous-unités. En effet, ces deux domaines vont s'associer pour former la tête du complexe protéique, notamment grâce à l'Arg261 de β_3 qui va venir pénétrer dans le core du β -propeller d' α_{Ib} à travers une poche essentiellement constituée d'acides aminés aromatiques. La majorité des mutations survenant dans ces deux domaines entraînent soit un défaut de formation du complexe, soit un blocage de maturation de celui-ci et de son trafic intra-cellulaire [94, 95]. Afin de mieux caractériser les mutations nouvellement identifiées dans ces domaines, notre approche a consisté à étudier par modélisation leur impact sur la structure tridimensionnelle du complexe. Le domaine β -propeller d' α_{Ib} est composé de 7 "pâles d'hélices", appelées "blade", organisées en quatre feuillets bêta anti-parallèles et reliés entre eux par des boucles, comportant les motifs « FG-GAP ». La répétition des motifs "FG-GAP" jouent un rôle clé dans cette organisation structurale des blades, ainsi que les quatre sites de fixation du calcium qui sont présents à la surface du domaine (blades 4 à 7). Dans la majorité des cas, les mutations retrouvées dans notre étude concernaient des motifs FG-GAP ou des sites de fixation du Ca^{2+} , où elles rompaient des liaisons hydrogènes essentielles à la structure de ces régions.

Le domaine β -I comprend six feuillets β centraux, entourés de huit hélices α . Il contient les sites bien connus : MIDAS, ADMIDAS et SyMBS [16]. Nous avons identifié sept mutations dans ce domaine, pour la plupart associées à une forme de type I ou II de TG, et une seule fois à une forme variante. Finalement, les mutations survenant dans le domaine β -I pouvaient être diversement associées à des anomalies quantitatives ou qualitatives d' $\alpha_{Ib}\beta_3$. Les mutations faux-sens P189S, D314Y et Y344S étaient toutes trois associées à une forme de type I de la maladie. Les deux résidus P189 et D314 sont extrêmement conservés entre les espèces et sont situés à proximité de l'R261 de β_3 au sein

de la structure tertiaire. Cet acide aminé est essentiel à l'association des deux sous-unités et toutes mutations affectant sa position est fortement pathogène. L'Y344 se situe à proximité du site MIDAS, dont on connaît le rôle essentiel dans la fonction de l'intégrine. C'est au niveau de ce site qu'a été identifiée la mutation D119Y chez un patient présentant une forme variante de la maladie [96], mais la mutation Y344S était associée à une forme de type I. Ceci confirme que ce site joue également un rôle essentiel dans la formation du complexe et pas uniquement dans sa fonction.

Au niveau de la sous-unité α_{IIb} , nous avons pu observer que le domaine calf-2 était une région protéique où survenait également assez fréquemment des mutations faux-sens. Sa structure est moins bien connue que celle du domaine β -propeller et les mutations faux-sens identifiées dans notre étude apporte donc des informations essentielles à la compréhension de son organisation. Ce domaine, situé juste en amont de la partie transmembranaire de la protéine, est constitué de feuillets β anti-parallèle organisés sous la forme d'un « tonneau ». Sa structure est maintenue en partie grâce à cinq résidus polaires, très conservés, et reliés entre eux par des liaisons hydrogènes. Le remplacement de la L955 ou de la T984, situées à proximité de ce réseau de liaisons, crée une instabilité au niveau de la structure dont la rigidité assure normalement la stabilisation du complexe à la surface membranaire. Les études précédemment publiées montraient que des mutations faux-sens survenant dans le domaine calf-2 n'empêchaient pas la formation du complexe, mais retardaient sa maturation [97, 98].

À l'exception d'une mutation située au niveau du peptide signal, toutes les mutations retrouvées dans β_3 , concernaient la partie extra-cellulaire de la protéine avec pour principal effet d'empêcher la biogénèse du complexe. La mutation c.187C>T, responsable du remplacement d'une arginine à la position 63 par une cystéine, est située dans le domaine PSI de la protéine. Jusqu'à présent seules trois mutations faux-sens ont été décrites

dans ce domaine et dans tous les cas, il s'agissait de résidus cystéine. La co-transfection transitoire du cDNA muté de β_3 et du cDNA normal d' α_{IIb} a permis de montrer que l'Arg63Cys reproduisait un phénotype de TG de type II puisque nous avons pu détecter par cytométrie en flux une expression résiduelle à la surface des cellules Cos-7 de l'ordre de 15%. Le Western-Blot montrait un retard de maturation de la sous-unité α_{IIb} probablement en lien avec la rupture d'un pont disulfure C52-C75 présent dans β_3 . Cette anomalie structurale du domaine PSI empêchait donc le complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ de maturer normalement et entraînait sa rétention intra-cellulaire, confirmant l'importance de ce domaine dans la biogénèse du complexe.

En aval du domaine PSI se trouve le domaine hybrid de β_3 , composé de feuillets β organisés sous la forme d'un « tonneau » avec des acides aminés hydrophobes orientés vers le centre de la structure. Parmi les mutations mises en évidence dans notre étude, la Lys118His, l'Arg119Gln et l'Arg131Pro, interféraient toutes avec l'expression du complexe, rompant des liaisons hydrogènes essentielles à la structure de ce domaine. Plus particulièrement, l'Arg131Pro située sur le bord supérieur du domaine hybrid introduisait une courbure juste en amont du segment qui relie le domaine β -I, confirmant l'importance de la conformation originelle du domaine hybrid, nécessaire à la biosynthèse normale d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Un point essentiel est à noter concernant nos résultats. Aucune nouvelle mutation dans les domaines transmembranaires ou intra-cytoplasmiques du complexe n'a été mise en évidence. Cependant, aucune mutation n'a jamais été rapportée jusqu'à présent dans le domaine transmembranaire. En revanche, cela est plus surprenant pour le domaine intra-cytoplasmique, car quelques mutations ont déjà été décrites. Ces mutations peuvent être associées à des formes variantes de la maladie [99]. Dans notre étude, seulement sept patients présentaient une forme variante de TG. Cette forme est peut-être la plus

intéressante à aborder car elle peut permettre de mieux comprendre les mécanismes fonctionnels de l'intégrine. Malheureusement, sur les sept patients inclus, une seule mutation a été nouvellement identifiée et celle-ci a été retrouvée de manière isolée (1 seul allèle muté), ne permettant pas de tirer de réelles conclusions sur son implication dans la fonction de l'intégrine. Au total, notre travail apporte donc essentiellement des informations sur la structure du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$, plus que sur les mécanismes fonctionnels de celui-ci.

Bien que la sous-unité β_3 soit exprimée dans des tissus largement différents, finalement, c'est le phénotype hémorragique qui reste le plus déterminant dans la TG. Malheureusement, notre travail n'a pas permis de mettre en évidence d'association évidente entre le génotype des patients et leur phénotype hémorragique. En revanche, dans un travail parallèle que nous avons effectué sur 24 patients, dont le génotype était bien identifié, nous avons pu montrer une corrélation entre certaines mutations et le développement d'anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$. Sur la base d'une revue de la littérature, Kashiwagi et al. ont également rapporté que la plupart des mutations (7/8) associées à la présence d'anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$, étaient des mutations tronquantes [65, 73]. L'exception concernait un patient homozygote pour une mutation faux-sens qui avait développé des anticorps après avoir été massivement transfusé en plaquettes. Dans notre étude, un des patients porteurs d'une mutation faux-sens avaient également été fortement transfusés avant de développer des anticorps. Nos résultats sont donc en accord avec ceux précédemment rapportés et confirment que les mutations tronquantes constituent un facteur de risque non négligeable de développer des anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$. En revanche, les patients présentant une forme de type II ou une forme variante ont peu de chance de s'immuniser au regard de l'expression résiduelle de l'intégrine dans

leurs plaquettes. En effet, dans notre étude, aucun des patients présentant une de ces formes ne s'était immunisé malgré le fait que tous avaient été transfusés à plusieurs reprises.

Les anticorps anti-plaquettes ont la capacité d'accélérer la clairance des plaquettes transfusées, mais aussi dans certains cas, d'inhiber leur fonction en bloquant le site de liaison du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ [69]. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence cet effet inhibiteur chez un seul patient sur les trois testés, ce qui est beaucoup trop limité pour en tirer des conclusions. Il reste encore un certain nombre d'énigmes concernant la physiologie de ces anticorps, notamment en termes de spécificité et de pouvoir d'inhibition. Ceci souligne l'importance de mettre en place des études plus larges, incluant un plus grand nombre de patients, afin de mieux comprendre les mécanismes de l'impact de ces anticorps [100]. L'étude des facteurs de risque environnementaux et génétiques impliqués dans la survenue de ces anticorps sont des éléments essentiels à la mise en place de thérapie ciblée chez ces patients. Depuis 2004, le facteur VII activé recombinant (Novoseven, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché pour le traitement des patients Glanzmann présentant des anticorps anti-plaquettes associés à une inefficacité des transfusions plaquettaires. Sur la base des résultats de notre travail, un algorithme décisionnel a pu être proposé pour la prise en charge de ces patients. Chez ceux présentant une forme de type II ou variante, les transfusions plaquettaires restent le traitement de référence. En revanche, chez les patients présentant une maladie de type I, le rFVIIa constitue une bonne alternative thérapeutique, et plus particulièrement pour ceux présentant des mutations tronquantes [77].

Finalement, probablement que l'identification d'autres facteurs génétiques, comme c'est le cas dans l'hémophilie, permettront de mieux évaluer le risque d'apparition de ces anticorps au cours du temps. La perspective serait d'inclure un plus grand nombre de patients. En France, on estime qu'il existe environ 300 cas de TG, et l'inclusion d'une

centaine de cas permettraient de mieux apprécier cette réelle association. D'autre part, l'inclusion d'un grand nombre de patients pourrait permettre d'évaluer d'autres facteurs génétiques avec des poids plus modestes, au sein de gènes de l'immunité par exemple. Actuellement, le développement des techniques de séquençage haut débit est tel que le nombre de patients à génotyper n'est plus une limite en soi. Ce projet aurait le deuxième avantage d'étendre encore plus, le spectre mutationnel de cette maladie et ainsi, de mieux appréhender, la relation structure-fonction de la principale intégrine plaquettaire.

6 REFERENCES

1. Di Minno G, Coppola A, Di Minno MN, Poon MC. Glanzmann's thrombasthenia (defective platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$): proposals for management between evidence and open issues. *Thrombosis and haemostasis*. 2009 Dec;102(6):1157-64.
2. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:10.
3. Italiano JE, Jr., Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*. 2003 Jun;1(6):1174-82.
4. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood*. 1990 Apr 1;75(7):1383-95.
5. Fiore M, Pillois X, Nurden P, Nurden AT, Austerlitz F. Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families. *Eur J Hum Genet*. 2011 Sep;19(9):981-7.
6. Nurden AT, Nurden P. Rebuttal: the French Gypsy mutation does not give rise to a particularly mild form of Glanzmann's thrombasthenia. *J Thromb Haemost*. 2003 Nov;1(11):2459.
7. Fiore M, Nurden AT, Vinciguerra C, Nurden P, Pillois X. Rapid diagnosis of the French gypsy mutation in Glanzmann thrombasthenia using high-resolution melting analysis. *Thrombosis and haemostasis*. 2010 Nov 3;104(5):1076-7.
8. Nurden A, Nurden P. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9 Suppl 1:76-91.
9. Rybarczyk BJ, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4035-43.

10. Danen EH, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *The Journal of pathology*. 2003 Dec;201(4):632-41.
11. Stupack DG, Cheresch DA. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):9022-9.
12. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British journal of cancer*. 2004 Feb 9;90(3):561-5.
13. Wehrle-Haller B, Imhof BA. Integrin-dependent pathologies. *The Journal of pathology*. 2003 Jul;200(4):481-7.
14. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jun;60(6):1135-57.
15. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1602-12.
16. Collier BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3011-25.
17. Mitchell WB, Li J, French DL, Collier BS. α IIb β 3 biogenesis is controlled by engagement of α IIb in the calnexin cycle via the N15-linked glycan. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2713-9.
18. Schlegel N, Gayet O, Morel-Kopp MC, Wyler B, Hurtaud-Roux MF, et al. The molecular genetic basis of Glanzmann's thrombasthenia in a gypsy population in France: identification of a new mutation on the α IIb gene. *Blood*. 1995 Aug 1;86(3):977-82.
19. de la Salle C, Schwartz A, Baas MJ, Lanza F, Cazenave JP. Detection by PCR and HphI restriction analysis of a splice site mutation at the 5' end of intron 15 of the platelet GPIIb (α IIb integrin) gene responsible for Glanzmann's thrombasthenia type I in

Gypsies originating from the Strasbourg area. *Thrombosis and haemostasis*. 1995 Sep;74(3):990-1.

20. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87.

21. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β 3. *Science (New York, NY)*. 2001 Oct 12;294(5541):339-45.

22. Springer TA. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α -subunits into a beta-propeller domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Jan 7;94(1):65-72.

23. Mitchell WB, Li JH, Singh F, Michelson AD, Bussel J, et al. Two novel mutations in the α IIb calcium-binding domains identify hydrophobic regions essential for α IIb β 3 biogenesis. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2268-76.

24. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunological reviews*. 2007 Aug;218:247-64.

25. Chouhan B, Denesyuk A, Heino J, Johnson MS, Denessiouk K. Conservation of the human integrin-type beta-propeller domain in bacteria. *PloS one*. 2011;6(10):e25069.

26. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science (New York, NY)*. 2002 Apr 5;296(5565):151-5.

27. Zhang K, Chen J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell adhesion & migration*. 2012 Jan-Feb;6(1):20-9.

28. Adair BD, Yeager M. Three-dimensional model of the human platelet integrin α IIb β 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Oct 29;99(22):14059-64.

29. Lau TL, Dua V, Ulmer TS. Structure of the integrin α IIB transmembrane segment. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Jun 6;283(23):16162-8.

30. Lau TL, Partridge AW, Ginsberg MH, Ulmer TS. Structure of the integrin β 3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles. *Biochemistry*. 2008 Apr 1;47(13):4008-16.

31. Lau TL, Kim C, Ginsberg MH, Ulmer TS. The structure of the integrin α IIB β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO journal*. 2009 May 6;28(9):1351-61.

32. Gottschalk KE. A coiled-coil structure of the α IIB β 3 integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state. *Structure*. 2005 May;13(5):703-12.

33. Li R, Babu CR, Lear JD, Wand AJ, Bennett JS, et al. Oligomerization of the integrin α IIB β 3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Oct 23;98(22):12462-7.

34. Ulmer TS, Yaspan B, Ginsberg MH, Campbell ID. NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin α IIB β 3 in aqueous solution. *Biochemistry*. 2001 Jun 26;40(25):7498-508.

35. Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas T, et al. A structural mechanism of integrin α (IIB) β (3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell*. 2002 Sep 6;110(5):587-97.

36. Weljie AM, Hwang PM, Vogel HJ. Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin α IIB- and β 3-subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Apr 30;99(9):5878-83.

37. Vinogradova O, Vaynberg J, Kong X, Haas TA, Plow EF, et al. Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Mar 23;101(12):4094-9.
38. Vinogradova O, Haas T, Plow EF, Qin J. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Feb 15;97(4):1450-5.
39. Hughes PE, O'Toole TE, Ylanne J, Shattil SJ, Ginsberg MH. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *The Journal of biological chemistry*. 1995 May 26;270(21):12411-7.
40. Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, et al. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Mar 22;271(12):6571-4.
41. Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Nakamoto T, et al. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Mar 4;100(5):2272-7.
42. Wegener KL, Campbell ID. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). *Molecular membrane biology*. 2008 Aug;25(5):376-87.
43. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*. 2007;25:619-47.
44. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1155-9.

45. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current opinion in cell biology*. 2007 Oct;19(5):495-507.
46. Luo BH, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Current opinion in cell biology*. 2006 Oct;18(5):579-86.
47. Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*. 2007 Jan 12;128(1):171-82.
48. Montanez E, Ussar S, Schifferer M, Bosl M, Zent R, et al. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes & development*. 2008 May 15;22(10):1325-30.
49. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fassler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature medicine*. 2008 Mar;14(3):325-30.
50. Robert P, Canault M, Farnarier C, Nurden A, Grosdidier C, et al. A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J Immunol*. 2011 May 1;186(9):5273-83.
51. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature cell biology*. 2007 Aug;9(8):858-67.
52. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science (New York, NY)*. 1999 Aug 13;285(5430):1028-32.
53. Butler B, Gao C, Mersich AT, Blystone SD. Purified integrin adhesion complexes exhibit actin-polymerization activity. *Curr Biol*. 2006 Feb 7;16(3):242-51.
54. Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & development*. 2009 Feb 15;23(4):397-418.
55. Oxley CL, Anthis NJ, Lowe ED, Vakonakis I, Campbell ID, et al. An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Feb 29;283(9):5420-6.

56. D'Andrea G, Colaizzo D, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G, et al. Glanzmann's thrombasthenia: identification of 19 new mutations in 30 patients. *Thrombosis and haemostasis*. 2002 Jun;87(6):1034-42.
57. Peretz H, Rosenberg N, Landau M, Usher S, Nelson EJ, et al. Molecular diversity of Glanzmann thrombasthenia in southern India: new insights into mRNA splicing and structure-function correlations of alphaIIb beta3 integrin (ITGA2B, ITGB3). *Human mutation*. 2006 Apr;27(4):359-69.
58. Kannan M, Ahmad F, Yadav BK, Kumar R, Choudhry VP, et al. Molecular defects in ITGA2B and ITGB3 genes in patients with Glanzmann thrombasthenia. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1878-85.
59. Saposnik B, Binard S, Fenneteau O, Nurden A, Nurden P, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in a large French cohort of MYH9-Related Disorders. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2014 Jul;2(4):297-312.
60. Nurden AT, Fiore M, Nurden P, Pillois X. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*. 2011 Dec 1;118(23):5996-6005.
61. Hay CR, Palmer B, Chalmers E, Liesner R, Maclean R, et al. Incidence of factor VIII inhibitors throughout life in severe hemophilia A in the United Kingdom. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6367-70.
62. Gouw SC, van den Berg HM. The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. *Semin Thromb Hemost*. 2009 Nov;35(8):723-34.
63. Conte R, Cirillo D, Ricci F, Tassi C, Tazzari PL. Platelet transfusion in a patient affected by Glanzmann's thrombasthenia with antibodies against GPIIb-IIIa. *Haematologica*. 1997 Jan-Feb;82(1):73-4.

64. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *British journal of haematology*. 2008 Jul;142(3):348-60.
65. Kashiwagi H, Kiyomizu K, Kamae T, Nakazawa T, Tadokoro S, et al. Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti- α IIb β 3 alloantibodies. *Int J Hematol*. 2011 Jan;93(1):106-11.
66. Levy-Toledano S, Tobelem G, Legrand C, Bredoux R, Degos L, et al. Acquired IgG antibody occurring in a thrombasthenic patient: its effect on human platelet function. *Blood*. 1978 Jun;51(6):1065-71.
67. Bellucci S, Damaj G, Boval B, Rocha V, Devergie A, et al. Bone marrow transplantation in severe Glanzmann's thrombasthenia with antiplatelet alloimmunization. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Feb;25(3):327-30.
68. Gruel Y, Brojer E, Nugent DJ, Kunicki TJ. Further characterization of the thrombasthenia-related idiotype OG. Antiidiotype defines a novel epitope(s) shared by fibrinogen B beta chain, vitronectin, and von Willebrand factor and required for binding to beta 3. *J Exp Med*. 1994 Dec 1;180(6):2259-67.
69. Jallu V, Diaz-Ricart M, Ordinas A, Pico M, Vezon G, et al. Two human antibodies reacting with different epitopes on integrin beta 3 of platelets and endothelial cells. *Eur J Biochem*. 1994 Jun 15;222(3):743-51.
70. Poon MC. Clinical use of recombinant human activated factor VII (rFVIIa) in the prevention and treatment of bleeding episodes in patients with Glanzmann's thrombasthenia. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(5):655-64.
71. Poon MC, Zotz R, Di Minno G, Abrams ZS, Knudsen JB, et al. Glanzmann's thrombasthenia treatment: a prospective observational registry on the use of recombinant human activated factor VII and other hemostatic agents. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1 Suppl 1):S33-6.

72. Guidelines for the administration of platelets. New York State Council on Human Blood and Transfusion Services. 2006.
73. Nurden AT, Kunicki T, Nurden P, Fiore M, Martins N, et al. Mutation analysis for a patient with Glanzmann thrombasthenia who produced a landmark isoantibody to the alphaIIb beta3 integrin. *J Thromb Haemost*. 2010 Aug;8(8):1866-8.
74. Martin I, Kriaa F, Proulle V, Guillet B, Kaplan C, et al. Protein A Sepharose immunoadsorption can restore the efficacy of platelet concentrates in patients with Glanzmann's thrombasthenia and anti-glycoprotein IIb-IIIa antibodies. *British journal of haematology*. 2002 Dec;119(4):991-7.
75. Taaning E, Knudsen FU, Thorsen S, Jonsson V. Immunization against platelet glycoprotein IIb-IIIa in Glanzmann's thrombasthenia. *Eur J Haematol*. 1997 May;58(5):360-1.
76. Leticee N, Kaplan C, Lemery D. Pregnancy in mother with Glanzmann's thrombasthenia and isoantibody against GPIIb-IIIa: Is there a foetal risk? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005 Aug 1;121(2):139-42.
77. Poon MC, D'Oiron R, Von Depka M, Khair K, Negrier C, et al. Prophylactic and therapeutic recombinant factor VIIa administration to patients with Glanzmann's thrombasthenia: results of an international survey. *J Thromb Haemost*. 2004 Jul;2(7):1096-103.
78. Santoro C, Rago A, Biondo F, Conti L, Pulcinelli F, et al. Prevalence of allo-immunization anti-HLA and anti-integrin alphaIIb beta3 in Glanzmann Thromboasthenia patients. *Haemophilia*. 2010 Sep 1;16(5):805-12.
79. Li P, Kupfer KC, Davies CJ, Burbee D, Evans GA, et al. PRIMO: A primer design program that applies base quality statistics for automated large-scale DNA sequencing. *Genomics*. 1997 Mar 15;40(3):476-85.

80. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*. 1998 Mar;8(3):175-85.
81. Bonfield JK, Smith K, Staden R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic acids research*. 1995 Dec 25;23(24):4992-9.
82. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*. 2010 Mar;10(2):219-40.
83. Laguerre M, Sabi E, Daly M, Stockley J, Nurden P, et al. Molecular dynamics analysis of a novel beta3 Pro189Ser mutation in a patient with glanzmann thrombasthenia differentially affecting alphaIIbbeta3 and alphavbeta3 expression. *PloS one*. 2013;8(11):e78683.
84. Peyruchaud O, Nurden AT, Milet S, Macchi L, Pannochia A, et al. R to Q amino acid substitution in the GFFKR sequence of the cytoplasmic domain of the integrin IIb subunit in a patient with a Glanzmann's thrombasthenia-like syndrome. *Blood*. 1998 Dec 1;92(11):4178-87.
85. Nurden AT, Ruan J, Pasquet JM, Gauthier B, Combrie R, et al. A novel 196Leu to Pro substitution in the beta3 subunit of the alphaIIbbeta3 integrin in a patient with a variant form of Glanzmann thrombasthenia. *Platelets*. 2002 Mar;13(2):101-11.
86. Jallu V, Dusseaux M, Panzer S, Torchet MF, Hezard N, et al. AlphaIIbbeta3 integrin: new allelic variants in Glanzmann thrombasthenia, effects on ITGA2B and ITGB3 mRNA splicing, expression, and structure-function. *Human mutation*. 2010 Mar;31(3):237-46.
87. Jin Y, Dietz HC, Montgomery RA, Bell WR, McIntosh I, et al. Glanzmann thrombasthenia. Cooperation between sequence variants in cis during splice site selection. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Oct 15;98(8):1745-54.

88. Pillois X, Fiore M, Heilig R, Pico M, Nurden AT. A novel amino acid substitution of integrin α IIb in Glanzmann thrombasthenia confirms that the N-terminal region of the receptor plays a role in maintaining beta-propeller structure. *Platelets*. 2013;24(1):77-80.
89. Li L, Bray PF. Homologous recombination among three intragene Alu sequences causes an inversion-deletion resulting in the hereditary bleeding disorder Glanzmann thrombasthenia. *American journal of human genetics*. 1993 Jul;53(1):140-9.
90. Burk CD, Newman PJ, Lyman S, Gill J, Collier BS, et al. A deletion in the gene for glycoprotein IIb associated with Glanzmann's thrombasthenia. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Jan;87(1):270-6.
91. Djaffar I, Caen JP, Rosa JP. A large alteration in the human platelet glycoprotein IIIa (integrin β 3) gene associated with Glanzmann's thrombasthenia. *Human molecular genetics*. 1993 Dec;2(12):2183-5.
92. Rosenberg N, Landau M, Luboshitz J, Rechavi G, Seligsohn U. A novel Phe171Cys mutation in integrin α causes Glanzmann thrombasthenia by abrogating $\alpha\beta$ complex formation. *J Thromb Haemost*. 2004 Jul;2(7):1167-75.
93. Canault M, Ghalloussi D, Grosdidier C, Guinier M, Perret C, et al. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *The Journal of experimental medicine*. 2014 Jun 30;211(7):1349-62.
94. Mansour W, Einav Y, Hauschner H, Koren A, Seligsohn U, et al. An α IIb mutation in patients with Glanzmann thrombasthenia located in the N-terminus of blade 1 of the beta-propeller (Asn2Asp) disrupts a calcium binding site in blade 6. *J Thromb Haemost*. 2009 Jan;9(1):192-200.
95. Nelson EJ, Li J, Mitchell WB, Chandy M, Srivastava A, et al. Three novel beta-propeller mutations causing Glanzmann thrombasthenia result in production of normally

stable pro-alphaIIb, but variably impaired progression of pro-alphaIIbbeta3 from endoplasmic reticulum to Golgi. *J Thromb Haemost.* 2005 Dec;3(12):2773-83.

96. Loftus JC, O'Toole TE, Plow EF, Glass A, Frelinger AL, 3rd, et al. A beta 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science (New York, NY.* 1990 Aug 24;249(4971):915-8.

97. Nurden AT, Breillat C, Jacquelin B, Combrie R, Freedman J, et al. Triple heterozygosity in the integrin alphaIIb subunit in a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *J Thromb Haemost.* 2004 May;2(5):813-9.

98. Losonczy G, Rosenberg N, Boda Z, Vereb G, Kappelmayer J, et al. Three novel mutations in the glycoprotein IIb gene in a patient with type II Glanzmann thrombasthenia. *Haematologica.* 2007 May;92(5):698-701.

99. Hauschner H, Mor-Cohen R, Seligsohn U, Rosenberg N. A mutation in the beta3 cytoplasmic tail causes variant Glanzmann thrombasthenia by abrogating transition of alphaIIb beta3 to an active state. *J Thromb Haemost.* 2012 Feb;10(2):289-97.

100. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia: the need for epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 2009 Nov;7(11):1875-7.